

27. 9. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 1日

出願番号
Application Number: 特願 2004-056452
[ST. 10/C]: [JP 2004-056452]

出願人
Applicant(s): 株式会社ファルマデザイン
平澤 明
辻本 豪三

REC'D 26 NOV 2004

WIPO

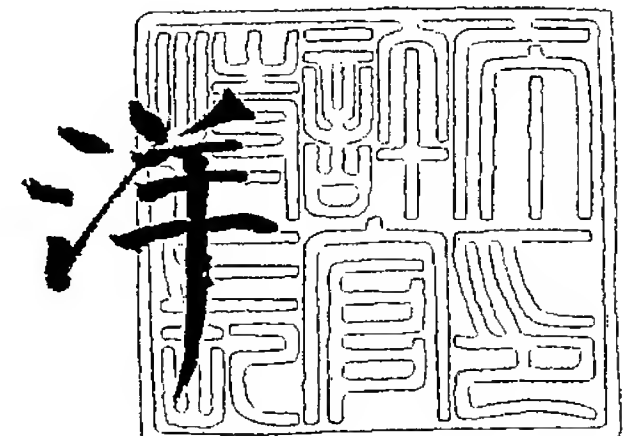
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 PDP-0049
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
A61K 38/00

【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区中町 1 - 2 1 - 4
【氏名】 平澤 明

【発明者】
【住所又は居所】 東京都世田谷区中町 1 - 1 4 - 1 8
【氏名】 辻本 豪三

【特許出願人】
【識別番号】 500386563
【氏名又は名称】 株式会社ファルマデザイン
【代表者】 古谷 利夫

【特許出願人】
【住所又は居所】 東京都世田谷区中町 1 - 2 1 - 4
【氏名又は名称】 平澤 明

【特許出願人】
【住所又は居所】 東京都世田谷区中町 1 - 1 4 - 1 8
【氏名又は名称】 辻本 豪三

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 139735
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 1 または配列番号 2 で表されるアミノ酸からなり、腸内分泌細胞からの G L P - 1 の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

【請求項 2】

配列番号 1 または配列番号 2 で表されるアミノ酸において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、腸内分泌細胞からの G L P - 1 の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

【請求項 3】

腸内分泌細胞上に存在する請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベクターを含んで成り、真性糖尿病に付随する高血糖症を治療するための医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 3 に記載のポリペプチドのリガンド。

【請求項 8】

腸内分泌細胞表面上に存在する請求項 1 乃至 3 に記載のポリペプチドと結合し、G L P - 1 放出を促進する請求項 7 に記載のリガンド。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載のリガンドを有効成分として含んで成り、真性糖尿病に付随する高血糖症を治療するための医薬組成物。

【請求項 1 0】

前記リガンドが 1 または複数の直鎖または分岐の遊離脂肪酸である請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

前記遊離脂肪酸の炭素数が 1 0 ～ 2 4 である請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

前記遊離脂肪酸の不飽和結合数が 0 ～ 6 である請求項 1 0 または 1 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 3】

前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 α リノレン酸、 γ リノレン酸、ホモ γ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 乃至 3 に記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 乃至 3 に記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 乃至 3 に記載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】血糖値の低下に供される医薬組成物

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、血糖値を低下せしめ、糖尿病の予防または治療に供される医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

現代社会において、糖尿病患者数の増加は著しく、その治療のために必要とされる社会的、経済的コストは莫大な金額にのぼり、医療分野における重大問題として、早期解決が望まれている。

【0 0 0 3】

糖尿病は、血液中に存在するグルコースを正常に代謝することができず、いわゆる高血糖状態を持続させ、身体機能に様々な悪影響を及ぼすものである。糖尿病の主な合併症として、網膜症、腎症、神経障害、動脈硬化などが挙げられるが、これらの合併症はさらに、失明、尿毒症、脳卒中、心筋梗塞などの深刻な病態を招く危険性を有している。

糖尿病の治療方法としては、食事療法、運動療法などにより代謝機能の正常化を図る方法の他、グルコース代謝に必要とされるインスリンを注射により投与する方法が行われている。

また、近年、インスリンを直接投与する方法の他にも、インスリンの生成、インスリンの分泌などを促進することにより、血糖値の低下を実現させる方法などの研究も活発に行われている。

【0 0 0 4】

インスリン分泌を調節するペプチドホルモンとして G L P - 1 (glucagon-like peptide-1; グルカゴン様ペプチド 1) が注目を浴びつつある。G L P - 1 は、回腸、大腸などに存在する腸内分泌細胞である L 細胞において生成されるプログルカゴンから翻訳後プロセッシングされて生じるペプチドホルモンである (Drucker, 1998)。グルコース濃度に応答してインスリンの分泌を誘導することから、特に I I 型 (インスリン非依存型) 糖尿病の治療に効果を示す可能性が指摘されてきた (Drucker, 2001; Thorens 及び Waeber, 1993)。さらに、 β 細胞の増殖、又は幹細胞からの β 細胞の新生を誘導する効果なども報告されており、I I 型糖尿病における β 細胞のアポトーシスの遅延や、I 型糖尿病に対する膵島移植の効果継続に有効であると推測される。

また、インスリン分泌の調節作用の他にも、中枢の視床下部に作用して「満腹感」の刺激、及び摂食の低減を誘導することが明らかとなっており (Turton 等, 1996; Flint 等, 1998)、糖尿病のみならず、肥満症を含む摂食障害への治療効果が期待されている。最近の研究によると、脂肪細胞から遊離される脂肪酸や T N F などの物質がインスリンの作用を妨害することが明らかにされており、肥満による血糖値の上昇が促進される機構も解明されつつある。従って、インスリンの分泌を促進するだけでなく、肥満化をも抑制する効果を併せ持つ G L P - 1 は糖尿病治療に対する画期的な治療剤を提供すると考えられる。

【0 0 0 5】

しかし、G L P - 1 を糖尿病の治療に適用するにあたり、生体内における G L P - 1 の半減期が非常に短いこと (Drucker, 2001; Thorens 及び Waeber, 1993)、ペプチド性であるが故に投与に際し注射による方法を取らざるを得ない点などが障害となっていた。

このような問題点を克服する方法として、内在性の G L P - 1 の分泌を促進することでインスリン分泌の調節を図ることが考えられる。

これまでに、G L P - 1 の分泌促進には脂肪酸が関係するとの指摘がされている。例えば、ラットに対してモノ不飽和脂肪酸を与えると G L P - 1 の分泌が促進され (非特許文献 1)、また、オレイン酸、パルミチン酸によりヒト腸管細胞株 (N C I - H 7 1 6) からの G L P - 1 分泌が促進される (非特許文献 2) などの報告が行われている。しかしな

がら、その一方では、ポリ不飽和脂肪酸またはモノ不飽和脂肪酸はGLP-1を介したインスリン分泌に影響を与えない（非特許文献3）、また、短鎖脂肪酸（SCFA）の血液への注入によって、血漿中のGLP-1濃度に変化は生じなかった（非特許文献4）など、前出の報告とは相反する結果も報告されている。さらに、ある種の脂肪酸がGLP-1の分泌を促進するとした場合において、その作用機序については全く明らかにされておらず、この点においても、脂肪酸とGLP-1促進との関連性における信憑性が疑問視されていた。

【0006】

本発明に係る組成物にはGタンパク質共役型レセプターであるGT01タンパク質、およびGT01タンパク質と特異的に結合するリガンドが含まれる。Gタンパク質共役型レセプターは、7個の膜貫通領域を有することから7回膜貫通型受容体（7TMR）と称されており（図1を参照のこと）、共役しているグアニンヌクレオチド結合タンパク質（以下、Gタンパク質と称する）の活性化を通じて、細胞内のシグナル伝達に参与している。

Gタンパク質共役型レセプターは、生体内の各機能細胞表面に存在し、それらの機能を調節するリガンド分子の標的となっており、該リガンド分子との結合を介して細胞内にシグナルを伝達している。伝達されたシグナルを受け取った細胞は、その細胞機能の活性化又は抑制化を受け、その結果、種々の生体内反応を惹起していく。従って、Gタンパク質共役型レセプターの機能を明らかにしていくことは、生体内反応を整合よく調整する医薬を開発する点においても、非常に重要なこととなっている。

近年、膨大な量のゲノム及びcDNA情報が入手可能となり、多くのGタンパク質共役レセプターが同定されてきたが、未だ機能及びその特異的なリガンドが明らかにされていないものも多く、その解析の進展が待たれている。

ヒトGT01タンパク質は、GPR120と称され、NP_859529としてGenBankに登録されているアミノ酸配列が同一である。しかしながら、GPR120の機能に関しては全く言及されておらず、生物学的役割については不明である（非特許文献5）。

また、Gタンパク質共役レセプターである14273レセプターと95%のアミノ酸同一性を有する。しかしながら、14273レセプターはそのリガンドが特定されておらず、その作用機序の詳細は明らかになっていない。また、該14273レセプターは、心臓において発現が認められ、該レセプターをコードする遺伝子によるトランスジェニックマウスの解析から、14273レセプターは心臓疾患に関与するものとして同定されている。従って、本発明において開示されるGT01ポリペプチドと14273レセプターはアミノ酸配列上の同一性は高いものの、その機能の比較から（後述する）、生理学的に全く異なる役割を担っている可能性が考えられる（特許文献1または2を参照のこと）。

【0007】

すでに、本発明の発明者らは、本発明に係るGT01タンパク質およびそのリガンドの作用により、摂食制御に機能するCCKの分泌を促進することを見出している（特願2003-180375）。そして、さらに本発明において、GT01タンパク質およびそのアゴニストの作用により血糖値の低下に機能するGLP-1の分泌が促進されることを見出した。従って、本発明に係るGT01タンパク質およびそのリガンドは摂食制御、血糖値の低下を可能ならしめることにより、肥満化を防止または軽減させ、併せて血糖値の低下を実現することにより糖尿病の治療に効果を発揮することが期待される。

【特許文献1】米国特許第6,448,005B1号（全文）

【特許文献2】特表2002-536997号公報（全文）

【非特許文献1】Rocca, A. S. 等, *Endocrinology* 142: 1148-1155, 2001

【非特許文献2】Reimer, R. A. 等, *Endocrinology* 142: 4522-4528, 2001

【非特許文献3】Cuche, G. 等, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279: G925-G930, 2000

【非特許文献4】Brynes, A. E., Am J Clin Nutr 72: 1111-1118, 2000.

【非特許文献5】Fredriksson, R. 等, FEBS 554: 381-388, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明においては、インスリンの分泌を促進することによりI型およびII型糖尿病の治療において有用な内在性GLP-1の分泌を誘導ならしめる医薬組成物を提供することを目的とする。

さらに、GLP-1の分泌に好適なGT01タンパク質に対するリガンドを同定する方法、該リガンドとGT01タンパク質との結合性を变化させる化合物を得るためのスクリーニング方法、該スクリーニング用キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者等は、上記事情に鑑み、GT01ポリペプチド（例えば、配列番号1及び2）の機能を解析し、そのリガンドとなる化合物を同定すべく、鋭意研究を行った結果、GT01ポリペプチドはヒト腸内分泌細胞表面に分布し、インスリン分泌の制御に機能するGLP-1の分泌を促進する機能を有することをここで初めて明らかにし、併せて、GT01ポリペプチドのリガンドとなる化合物を明らかにした。

なお、本明細書中においては、「ポリペプチド」と「タンパク質」なる用語は特に注記しないかぎり、同じ意味に用いられるものとする。

すなわち、上記課題は以下の(1)～(12)によって解決される。

(1) 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸からなり、腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

ここで「細胞」とは、特に注記しない限り哺乳動物細胞のことであり、特に、限定はしないが、生体内に存在して、GLP-1を放出する能力を有する細胞（例えば、腸内分泌細胞であるL細胞など）、又は*in vitro*においてGLP-1を放出する能力を有する株化細胞（例えば、STC-1細胞、

NCI-H716細胞、GLUTag細胞）などを指す（本明細書中において以下同様）。

(2) 配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を促進する活性を有するポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

(3) 腸内分泌細胞上に存在する上記(1)または(2)に記載のポリペプチドもしくは該ポリペプチドの塩。

(4) 上記(1)または(2)に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

(5) 上記(4)に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

(6) 上記(5)に記載のベクターを含んで成り、真性糖尿病に付随する高血糖症を治療するための医薬組成物。

(7) 上記(1)乃至(3)に記載のポリペプチドのリガンド。

(8) 腸内分泌細胞表面上に存在する上記(1)乃至(3)に記載のポリペプチドと結合し、GLP-1放出を促進する上記(7)に記載のリガンド。

(9) 上記(7)または(8)に記載のリガンドを有効成分として含んで成り、真性糖尿病に付随する高血糖症を治療するための医薬組成物。

(10) 前記リガンドが1または複数の直鎖または分岐の遊離脂肪酸である上記(9)に記載の医薬組成物。

(11) 前記遊離脂肪酸の炭素数が10～24である上記(10)に記載の医薬組成物。

(12) 前記遊離脂肪酸の不飽和結合数が0～6である上記(10)または(11)に記載

載の医薬組成物。

(13) 前記遊離脂肪酸が、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 α リノレン酸、 γ リノレン酸、ホモ γ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸からなるグループから選択される請求項10に記載の医薬組成物。

ここで、上記(13)に記載の脂肪酸に異性体が存在する場合、全ての異性体を含むものとするが、例えば、エイコサトリエノイン酸では、特にcis-5, 8, 11-エイコサトリエノイン酸が好ましく、エイコサジエン酸では、特にcis-11, 14-エイコサジエン酸が好ましく、エイコサトリエン酸では、特にcis-11, 14, 17-エイコサトリエン酸が好ましく、エイコサテトラエン酸では、特にcis-7, 10, 13, 16-エイコサテトラエン酸が好ましく、エイコサペンタエン酸では、cis-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸、all-cis-7, 10, 13, 16, 19-エイコサペンタエン酸が好ましく、ドコサヘキサエン酸では、特にcis-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸が好ましい。

(14) 上記(1)乃至(3)に記載されたポリペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドの決定方法。

(15) 上記(1)乃至(3)に記載されたポリペプチドまたはその塩を使用することを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング方法。

(16) 上記(1)乃至(3)に記載されたポリペプチドまたはその塩を構成要素として含むことを特徴とする、該ポリペプチドまたはその塩に対するリガンドと該ポリペプチドまたはその塩との結合性を変化させる物質のスクリーニング用キット。

【発明の効果】

【0010】

本発明により提供される医薬組成物を用いることにより、腸内分泌細胞からのGLP-1の分泌を促進させることができる。その結果、膵臓の β 細胞からのインスリンの分泌の促進、 β 細胞の増殖、幹細胞からの β 細胞の新生誘導などの効果が期待できる。

また、II型糖尿病における β 細胞のアポトーシスの遅延、I型糖尿病に対する膵島移植の効果継続の効果が期待できる。

【0011】

また、本発明により提供される医薬組成物も用いることにより、「満腹感」を生じさせ、摂食の低減を誘導することが可能となるため、糖尿病の症状を亢進すると考えられる肥満をも抑制し、血糖値の低減を介した糖尿病の治療にさらなる効果が期待できる。

【0012】

さらに、本発明により提供されるリガンドの同定方法を用いることで、GLP-1の分泌を効果的に制御し得る新規化合物の同定が可能となり、血糖値の低減を介した糖尿病の治療剤の開発が期待できる。

【0013】

さらにまた、本発明により提供されるスクリーニング方法、またはスクリーニングキットを用いることで、GT01に対する既存のリガンドの結合様式を調節し得る新規化合物を同定することが可能となり、血糖値の低減を介した糖尿病の治療剤の開発が期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

1. GT01ポリペプチドをコードする遺伝子のクローニング

本発明における「GT01ポリペプチド」とは、配列番号1または配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するGタンパク質共役型レセプター、または配列番号1もしくは配列

番号2で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、腸内分泌細胞（例えば、L細胞、）若しくは腸内分泌細胞株（例えば、STC-1、NC1-H716細胞、GLUTag細胞株等）表面に分布し、そのリガンドの結合により、GLP-1の分泌のためのシグナルを細胞内に伝達するGタンパク質共役型レセプターのことである。

【0015】

本発明におけるGT01ポリペプチド遺伝子は、公的なデータベース（NCBI）に登録されている配列情報（登録番号；NM_181748（マウス）、NM_181745（ヒト）など）に基づいて作製されたPCRプライマーを用いて、cDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリー等からクローニングすることができる。

PCRプライマーの設計は、primer3

(Whitehead

Institute for Biomedical Research.)等のプライマー設計ソフトを用いて行うことができる。また、PCRプライマー合成は、標準的な合成技術、例えば、自動DNA合成装置などを用いて行うことができるが、商業的に入手してもよい。PCR反応によって増幅が予想される増幅産物の長さは、増幅効率およびその後のアガロースゲルによる分離能および塩基配列解析が容易であるような長さが好ましく、例えば、80～200塩基になるようにデザインするのがよい。作成したPCRプライマーを用いて、cDNAライブラリー等を鋳型にしてPCR反応を行い、増幅産物が目的の産物であることを、配列決定を行うなどして確認する。

【0016】

ここで用いられる、cDNAライブラリーはヒトを含むあらゆる動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコなど）の細胞、限定はしないが、例えば、免疫系細胞、血球系細胞、線維芽細胞、脾細胞、肝細胞、骨髄細胞、すい臓細胞、ランゲルハンス細胞、上皮細胞、筋細胞、神経細胞、グリア細胞、脂肪細胞、若しくはこれらの株化細胞、若しくはこれらの前駆細胞などから調製したものでもよく、又はあらゆる動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ウシ、サル、ヒツジ、イヌ、ネコなど）の組織、限定はしないが、例えば、脳、脊髄、下垂体、胸腺、抹消血、脾臓、リンパ組織、下垂体、胃、すい臓、腎臓、生殖腺、甲状腺、胆嚢、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などから調製したものでもよい。cDNAライブラリーの調製は、当該技術分野における通常の技術を用いて行うことができる（例えば、Sambrook等、1989などを参照のこと）。

【0017】

2. GT01ポリペプチドに対するリガンド

本明細書中の「リガンド」とは、受容体に適合する化学分子のことで、「アゴニスト」および「アンタゴニスト」の両方の概念が含まれる。

また、本明細書中における「アゴニスト」には、内在性のGT01ポリペプチドの生物学的活性（リガンドの結合により、GLP-1の分泌のためのシグナルを細胞内に伝達する活性）を誘導する分子のいずれもが含まれる。一方「アンタゴニスト」には、アゴニストと競合することで、内在性GT01ポリペプチドの生物学的活性の一部または全てを阻害し、中和させる分子のいずれもが含まれる。本発明の「アゴニスト」は、限定はしないが、特に、GLP-1の分泌を促進する効果を有すると考えられる。

(1) リガンドの同定

GT01ポリペプチドの生物学的活性（リガンドの結合により、GLP-1分泌のためのシグナルを細胞内に伝達する活性）を検出ためのアッセイ系に試験されるべき化合物等を添加した場合、GT01ポリペプチドの生物学的活性が促進されれば、該化合物はアゴニストであり、逆に活性が抑制されれば、該化合物はアンタゴニストである。具体的には、限定はしないが、例えば、後述の実施例にて示す細胞内カルシウム濃度の測定において、該アッセイで使用する細胞に試験化合物を接触させた場合に、細胞内カルシウム濃度が上昇すれば、該試験化合物はアゴニストであり、アゴニストの存在下においても細胞内カ

ルシウム濃度の上昇を阻害すれば、該試験化合物はアンタゴニストであると判断することができる。

【0 0 1 8】

(2) リガンドの同定方法

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の G T 0 1 タンパク質またはその部分ペプチドと候補物質（試験物質）とを接触させた場合の G T 0 1 タンパク質または該部分ペプチドに対する候補物質の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。より具体的には、本発明は、(i) 標識した試験化合物を、G T 0 1 タンパク質もしくはその塩、または G T 0 1 の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した候補物質の G T 0 1 もしくはその塩、または G T 0 1 の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする G T 0 1 タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法、(i i) 標識した候補物質を、G T 0 1 タンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した候補物質の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする G T 0 1 に対するリガンドの同定方法、(i i i) 標識した候補物質を、G T 0 1 タンパク質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した G T 0 1 タンパク質に接触させた場合における、標識した候補物質の G T 0 1 タンパク質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする G T 0 1 に対するリガンドの同定方法、(i v) 候補物質を G T 0 1 タンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、G T 0 1 タンパク質を介した細胞刺激活性（例えば、細胞内カルシウム濃度など）を測定することを特徴とする G T 0 1 タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法、ならびに (v) 候補物質を、G T 0 1 をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによってその細胞膜上に発現した受容体タンパク質に接触させた場合における、受容体タンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、細胞内カルシウム遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質リン酸化など）を測定することを特徴とする本発明の G T 0 1 タンパク質またはその塩に対するリガンドの同定方法を提供する。

本発明のリガンド同定方法に用いられる G T 0 1 タンパク質としては、G T 0 1 タンパク質またはその部分ペプチドを含有するものであればいずれであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた G T 0 1 タンパク質が特に好ましい。

【0 0 1 9】

(3) アンチセンス RNA 又は DNA

G T 0 1 遺伝子に対する、アンチセンス RNA 又は DNA は有効なアンタゴニストとして作用する可能性がある。アンチセンス RNA 又は DNA 分子は標的の m RNA に対してハイブリダイズして翻訳を阻害することにより標的因子の機能を阻害する。アンチセンス RNA は、例えば、i n v i v o において m RNA とハイブリダイズし、m RNA から G T 0 1 ポリペプチドへの翻訳を阻害するようにデザインされる (Okano 等, 1991)。また、DNA オリゴヌクレオチドは、例えば、G T 0 1 遺伝子の転写開始領域に対して相補的となるようにデザインされ、その結果 G T 0 1 の発現を阻害する (Cohen, 1989)。

これらのアンチセンス RNA 又は DNA が G T 0 1 ポリペプチドの発現を阻害するよう i n v i v o において発現し得るように細胞へ導入することができる。アンチセンス DNA が用いられる場合には、例えば、標的遺伝子配列の約 - 1 0 と + 1 0 の間の位置に結合するオリゴヌクレオチドであることが望ましい。

【0 0 2 0】

(3) 抗 G T 0 1 ポリペプチド抗体

本発明は、G T 0 1 ポリペプチドと特異的に結合する抗体、及び F a b 又は (F a b)₂ などの抗体断片を含む。

本明細書中の「抗体」（抗 G T 0 1 ; アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む）には、G T 0 1 ポリペプチドに対するモノエピトープ特異的抗 G T 0 1 ポリペプチド抗体、ポリエピトープ特異的抗 G T 0 1 ポリペプチド抗体、単一鎖抗体、及びこれらの断片

が含まれる。

これらの抗体には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体などが含まれる。

(3) - 1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、例えば、哺乳類宿主動物に対して、免疫原及びアジュバントの混合物をインジェクトすることにより調製することができる。通常は、免疫原及び／又はアジュバントを宿主動物の皮下又は腹腔内へ複数回インジェクトする。免疫原には G T 0 1 ポリペプチド及びその異種ポリペプチドとの融合体又はこれらの断片が含まれる。アジュバントの例には、完全フロイントアジュバント及びモノホスホリル脂質 A 合成ートレハロースジコリノミコレート (M P L - T D M) が含まれる。免疫応答を増強するために、免疫原は、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、血清アルブミン、ウシチログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターなどの免疫原性を有するタンパク質に結合させたのち、インジェクトしてもよい。

あるいは、I g Y 分子を産生するニワトリを用いて調製してもよい (Schade 等, 1996)。

抗体産生方法の詳細は、例えば、Ausubel 等, 1987 又は Harlow 及び Lane, 1988 を参照のこと。

【 0 0 2 1 】

(3) - 2. モノクローナル抗体

抗 G T 0 1 ポリペプチドモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法を用いて調製される (Milstein 及び Cuello, 1983)。

この方法には以下に示す 4 つの工程が含まれる：(i) 宿主動物または、宿主動物由来のリンパ球を免疫する、(ii) モノクローナル抗体分泌性 (又は潜在的に分泌性) のリンパ球を回収する、(iii) リンパ球を不死化細胞に融合させる、(iv) 所望のモノクローナル抗体 (抗 G T 0 1 ポリペプチド) を分泌する細胞を選択する。

マウス、ラット、モルモット、ハムスター、又は他の適当な宿主動物が免疫動物として選択され、免疫原がインジェクトされる。あるいは、免疫動物から取得したリンパ球を *in vitro* で免疫化してもよい。ヒト細胞が望ましい場合には、末梢血リンパ球 (P B L s) が一般に使用される。しかしながら、他の哺乳類由来の脾臓細胞又はリンパ球がより一般的で好ましい。免疫原には、G T 0 1 ポリペプチド及びその異種ポリペプチドとの融合体又はこれらの断片が含まれる。

免疫後、宿主動物から得られたリンパ球はハイブリドーマ細胞を樹立するために、ポリエチレングリコールなどの融合剤を用いて不死化細胞株と融合される (Goding, 1996)。融合細胞としては、トランスフォーメーションによって不死化された齧歯類、ウシ、又はヒトのミエローマ細胞が使用されるか、ラットもしくはマウスのミエローマ細胞株が使用される。細胞融合を行った後、融合しなかったリンパ球及び不死化細胞株の成長又は生存を阻害する一又は複数の基質を含む適切な培地中で細胞を生育させる。通常の技術では、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H G P R T 又は H P R T) を欠く親細胞を使用する。この場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンが H G P R T 欠損細胞の成長を阻害し、ハイブリドーマの成長を許容する培地 (H A T 培地) に添加される。

【 0 0 2 2 】

モノクローナル抗体の調製にあたり、好ましい不死化細胞株はマウスミエローマ株で、アメリカンタイプカルチャーコレクション (Manassas, VA) より入手可能である。ヒトミエローマ及びマウスーヒトヘテロミエローマ細胞株による、ヒトモノクローナル抗体産生に関しては、Kozbor 等, 1984 を参照のこと。

ハイブリドーマ細胞は細胞外に抗体を分泌するため、G T 0 1 ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の産生の有無に関し、培養液を用いて確認することができる。産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、ラジオイムノアッセイ (R I A) 又は酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) などの免疫沈降又は *in vitro* での結合アッセイによ

り評価することができる (Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999)。

抗G T 0 1 ポリペプチドモノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマ細胞は限界希釈法及びサブカルチャーにより単一クローンとして単離することができる (Goding, 1996)。適切な培地にはダルベッコ改変イーグル培地、R P M I - 1 6 4 0、場合によっては、タンパク質を含まない培地もしくは無血清培地などが含まれる (例えば、U l t r a D O M A P F、またはH L - 1; Biowhittaker; Walkersville, MD)。また、ハイブリドーマ細胞は、適切な宿主動物の腹水中で増殖させてもよい。

【0 0 2 3】

モノクローナル抗体は、培地又は腹水からプロテインAセファロース、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、硫安沈殿又はアフィニティークロマトグラフィー (Harlow及びLane, 1988; Harlow及びLane, 1999) などの当業者にとって周知の方法によって単離及び精製される。

また、モノクローナル抗体は遺伝子組換え技術によっても作製することができる (米国特許第4, 1 6 6, 4 5 2号)。抗G T 0 1 ポリペプチド抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株から目的のモノクローナル抗体ポリペプチドをコードする遺伝子を同定するのに、例えば、マウスの重鎖及び軽鎖抗体遺伝子と特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いてもよい。その結果、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子が取得された場合は、その遺伝子の配列を決定することにより目的の抗体遺伝子を同定することができる。同定され、単離された抗体遺伝子のD N A断片は、モノクローナル抗体を発現させるために、適当な発現ベクターに導入し、該ベクターを他のI gタンパク質を生産しないs i m i a n C O S - 7細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、又はミエローマ細胞などのホスト細胞中へトランスフェクトする。単離されたD N A断片は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード化配列を相同なマウス配列と置換することにより (米国特許第4, 8 1 6, 5 6 7号; Morrison等, 1987)、又は非I gポリペプチドをコードする配列の全て又は一部とI gコード化配列を融合することにより、修飾することができる。そのような非I gポリペプチドは、キメラ二価抗体を作製するために、抗体の定常ドメインと置換することが可能であり、又は抗原結合部位の定常ドメインと置換することができる。

【0 0 2 4】

(3) - 3. ヒト化及びヒト抗体

抗G T 0 1 ポリペプチド抗体には、ヒト化又はヒト抗体が含まれる。非ヒト抗体のヒト化型は、非ヒトI g由来の最小配列を含むキメラI g s、I g鎖又は断片 (F v, F a b, F a b', F (a b')₂ 又は他の抗体の抗原結合領域など) である。

一般に、ヒト化抗体は非ヒト由来のI gから導入された一又は複数のアミノ酸残基を持つ。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、可変ドメインから選ばれる。ヒト化抗体は、例えばマウスのC D R s又はC D R配列と対応するヒト抗体配列とを置換することにより作製することができる (Jones等, 1986; Riechmann等, 1988; Verhoeyen等, 1988)。つまり、ヒト化抗体とは、典型的には、ヒトI g中の特定のC D R残基がマウスの相当部位由来のC D R残基と置換されているヒト抗体のことである。ヒト化抗体には、マウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種のC D Rであって、抗原に対する所望の特異的親和性を持つ残基により、置換されるヒトI g sが含まれる。また、非ヒト由来の残基によって、ヒトI gのF vフレームワーク残基が置換される場合もある (Jones等, 1986; Presta, 1992; Riechmann等, 1988)。

【0 0 2 5】

(4) G T 0 1 ポリペプチドに対するリガンド

リガンドを決定する方法においては、G T 0 1 受容体タンパク質と試験化合物 (候補リガンド) とを接触させた場合の、例えば、該受容体タンパク質の細胞内移行を確認する方法、該受容体タンパク質を発現する細胞の刺激活性を測定する方法などが使用可能であり、当業者における通常の技術常識の範囲内において実施可能である。

【0 0 2 6】

具体的には、例えば、本発明における G T 0 1 受容体タンパク質と蛍光タンパク質（例えば、G F P、C F P、Y F P 又は D s R E D など）とのキメラ融合タンパク質を発現するための発現ベクターを試験細胞表面上に発現させ、試験化合物と接触させた場合の該キメラタンパク質の細胞内移行を蛍光顕微鏡等で観察することにより、試験化合物がリガンド（アゴニスト又はアンタゴニスト）として機能し得るか否か検討することができる。蛍光タンパク質とのキメラ融合タンパク質を発現させるベクターは、市販品（例えば、p D s R e d、p E G F P、p C F P など、Clontech社）などの蛍光タンパク質遺伝子が挿入されたベクターに本発明の G T 0 1 遺伝子のフレームが合うように挿入することで、構築することができる。

また、G T 0 1 受容体タンパク質を細胞表面上に発現させる細胞と試験化合物を接触させた場合において、受容体タンパク質を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $C a^{2+}$ 遊離、細胞内 c A M P 生成、イノシトールリン酸産生など）を検出することによっても候補リガンドを同定することができる。本発明においては、細胞内の遊離 $C a^{2+}$ 濃度を測定する方法が用いられる。細胞内 $C a^{2+}$ 濃度の測定は、当業者にとって周知の技術を用いることで実施することが可能である。例えば、 $C a^{2+}$ と結合することで蛍光を発する蛍光物質を用いる方法が一般的によく用いられる。

本発明において好ましいリガンド同定の方法は、蛍光タンパク質と G T 0 1 受容体タンパク質のキメラ融合体を用いた細胞内移行による方法、及び細胞内 $C a^{2+}$ 濃度変化を検出する方法である。

【0027】

3. 細胞培養

本発明の G T 0 1 ポリペプチドのリガンドを同定するために、適切な細胞表面上に該ポリペプチドを機能し得る状態で発現させる必要がある。

ここで使用可能な細胞には、哺乳動物細胞及びその株化細胞であれば利用可能である。適切な細胞又は細胞株は、当業者であれば容易に選択することができる。例えば、C H O 細胞、S T C - 1 細胞、G L U T a g 細胞又は H E K 細胞などが利用可能である。

細胞を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20 % の胎児牛血清を含む M E M 培地、D M E M 培地等が用いられ、必要に応じてグルコース、グルタミン、抗生物質等が適宜添加される。p H は約 6 ~ 8 であるのが好ましく、温度は約 37 °C、 $C O_2$ 濃度は約 5 % が望ましい。

【0028】

4. G T 0 1 ポリペプチドの哺乳動物細胞内での発現

本発明のリガンドを同定するために、G T 0 1 ポリペプチドを、適切な哺乳動物細胞内で発現させ、該細胞表面上に分布させる必要がある。

G T 0 1 ポリペプチドの安定発現株を得るために、適切なベクター（p C D N など）に本発明の G T 0 1 ポリペプチド（実質的に同一なポリペプチド及びそれらの部分ペプチドも含む。本明細書中において同様）のみ、又は他のタンパク質（例えば、G F P、G 1 6 など）との融合体ポリペプチドをコードする D N A を挿入し、該ベクターを目的の細胞内へ導入する。

動物細胞へのベクターの導入方法としては、D E A E デキストラン法（Lopata等, 1984）、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（Chen及びOkayama, 1988）、カチオン性脂質による方法（Elroy-Stein及びMoss, 1990）等が挙げられる。

また、安定にトランスフォームされた組換え体細胞を選択するためのマーカーとしては、限定はしないが、ハイグロマイシン耐性マーカー（H y g^r）、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（d h f r）、アンピシリン耐性遺伝子（A m p^r）、カナマイシン耐性遺伝子（K a n^r）、ネオマイシン耐性遺伝子（N e o^r, G 4 1 8）などが利用可能である。

【0029】

5. G T 0 1 ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを含む医薬組成物

G T 0 1 ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストは、薬学的に受容可能な担体と

共に、生体に対して悪影響を及ぼさない医薬組成物の形態で治療剤として使用され得る。

「薬学的に受容可能な担体」は、溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌及び抗真菌剤、アイソトニックに作用して吸着を遅らせる薬剤及びその類似物を含み、薬剤的投与に適するもののことである (Gennaro, 2000)。該担体及び該担体を希釈するために好ましいものの例には、限定はしないが、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、及び 5 % のヒト血清アルブミンが含まれる。また、リポソーム及び不揮発性油などの非水溶性媒体も用いられる。さらに、本発明の G T 0 1 ポリペプチド及び抗 G T 0 1 ポリペプチド抗体を含む該ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストの活性を保護又は促進するような、特定の化合物も該組成物中に取り込まれ得る。

【 0 0 3 0 】

(1) 医薬組成物の調製

本発明の医薬組成物は、静脈内、経口への投与、胃への直接投与を含む、治療上適切な投与経路に適合するように製剤化される。静脈内への投与、または胃への直接投与に使用される溶液又は懸濁液には、限定はしないが、注射用の水などの滅菌的希釈液、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒、ベンジルアルコール又は他のメチルパラベンなどの保存剤、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなどの無痛化剤、エチレンジアミンテトラ酢酸 (E D T A) などのキレート剤、酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウム又はデキストロースなど浸透圧調製のための薬剤を含んでもよい。

p H は塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口的標品はアンプル、ガラスもしくはプラスチック製の使い捨てシリンジ又は複数回投与用バイアル中に収納される。

【 0 0 3 1 】

(2) 注射可能な製剤

注射に適する医薬組成物には、滅菌された注射可能な溶液又は分散媒であって、使用時に調製するための滅菌水溶液 (水溶性の) 又は分散媒及び滅菌されたパウダー (凍結乾燥されたタンパク質、核酸などを含む) が含まれる。静脈内の投与に関し、適切な担体には生理食塩水、静菌水、C R E M O P H O R E L ^{T M} (BASF, Parsippany, N.J.)、又はリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) が含まれる。注射剤として使用する場合、組成物は滅菌的でなくてはならず、また、シリンジを用いて投与されるために十分な流動性を保持していなくてはならない。該組成物は、調剤及び保存の間、化学変化及び腐食等に対して安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物由来のコンタミネーションなどが生じてはならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、及び適切な混合物を含む溶媒又は分散媒培地を使用することができる。例えば、レクチンなどのコーティング剤を用い、分散媒においては必要とされる粒子サイズを維持し、界面活性剤を用いることにより適度な流動性が維持される。種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルなどは、微生物のコンタミネーションを防ぐために使用可能である。また、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール及び塩化ナトリウムのような等張性を保つ薬剤が組成物中に含まれてもよい。吸着を遅らせることができる組成物には、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤が含まれる。

滅菌的な注射可能溶液は、必要な成分を単独で又は他の成分と組み合わせた後に、適切な溶媒中に必要量の活性化化合物を加え、滅菌することで調製される。一般に、分散媒は、基本的な分散培地及び上述したその他の必要成分を含む滅菌的媒体中に活性化化合物を取り込むことにより調製される。滅菌的な注射可能な溶液の調製のための滅菌的なパウダーの調製方法には、活性化成分及び滅菌溶液に由来する何れかの所望な成分を含むパウダーを調製する真空乾燥及び凍結乾燥が含まれる。

【 0 0 3 2 】

(3) 経口組成物

通常、経口組成物には、不活性な希釈剤又は体内に取り込んでも害を及ぼさない担体が含まれる。経口組成物には、例えば、ゼラチンのカプセル剤に包含されるか、加圧されて錠剤化される。経口的治療のためには、活性化合物は賦形剤と共に取り込まれ、錠剤、トローチ又はカプセル剤の形態で使用される。また、経口組成物は、流動性担体を用いて調製することも可能であり、流動性担体中の該組成物は経口的に適用される。さらに、薬剤的に適合する結合剤、及び／又はアジュバント物質などが包含されてもよい。

錠剤、丸薬、カプセル剤、トローチ剤及びその類似物は以下の成分又は類似の性質を持つ化合物の何れかを含み得る：微結晶性セルロースのような賦形剤、アラビアゴム、トラガント又はゼラチンなどの結合剤；スターチ又はラクトース、アルギン酸、P R I M O G E L、又はコーンスターチなどの膨化剤；ステアリン酸マグネシウム又はS T R R O T E Sなどの潤滑剤；コロイド性シリコン二酸化物などの滑剤；スクロース又はサッカリンなどの甘味剤；又はペパーミント、メチルサリシル酸又はオレンジフレーバーなどの香料添加剤。

【0 0 3 3】

(5) 全身投与

また、全身投与は経粘膜的又は経皮的に行うことができる。経粘膜的又は経皮的投与について、標的のバリアーを透過することができる浸透剤が選択される。経粘膜浸透剤は界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経鼻スプレー又は坐薬は経粘膜的な投与に対して使用することができる。経粘膜的投与に対して、活性化合物はオイントメント、軟膏、ジェル又はクリーム中に製剤化される。

また、化合物は、直腸への送達に対して、坐薬（例えば、ココアバター及び他のグリセリドなどの基剤と共に）又は滞留性の浣腸の形態で調製することもできる。

(6) 担体

本発明のG T 0 1 ポリペプチド及び抗G T 0 1 ポリペプチド抗体を含む該ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストは、植込錠及びマイクロカプセルに封入された送達システムなどの制御放出製剤として、体内から即時に除去されことを防ぎ得る担体を用いて調製することができる。エチレンビニル酢酸塩、ポリエチレングリコール、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの、生物分解性、生物適合性ポリマーを用いることができる。このような材料は、ALZA Corporation(Mountain View, CA)及びNOVA Pharmaceuticals, Inc.(Lake Elsinore, CA)から入手することが可能で、また、当業者によって容易に調製することもできる。また、リポソームの懸濁液も薬学的に受容可能な担体として使用することができる。有用なリポソームは、限定はしないが、ホスファチジルコリン、コレステロール及びP E G誘導ホスファチジルエタノール(P E G - P E)を含む脂質組成物として、使用に適するサイズになるように、適当なポアサイズのフィルターを通して調製され、逆相蒸発法によって精製される。例えば、抗体のF a b'断片などは、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに結合させてもよい(Martin及びPapahadjopoulos, 1982)。詳細な調製方法は、例えば、Eppstein等, 1985; Hwang等, 1980中の記載を参照のこと。

【0 0 3 4】

(7) 投与量

本発明のG T 0 1 ポリペプチド又は該ポリペプチドをコードする遺伝子等による特定の疾患の治療又は予防において、適切な投与量レベルは、投与される患者の状態、投与方法等に依存するが、当業者であれば、容易に最適化することが可能である。

注射投与の場合は、例えば、一日に患者の体重あたり約0.1 μ g/kgから500 mg/kgを投与するのが好ましく、一般に一回又は複数回に分けて投与され得るであろう。好ましくは、投与量レベルは、一日に約0.1 μ g/kgから約250 mg/kgであり、より好ましくは一日に約0.5～約100 mg/kgである。

経口投与の場合は、組成物は、好ましくは1.0から1000 mgの活性成分を含む錠剤の形態で提供され、好ましくは治療されるべき患者に対する投与量に含まれる有効活性

成分は、1. 0, 5. 0, 10. 0, 15. 0, 20. 0, 25. 0, 50. 0, 75. 0, 100. 0, 150. 0, 200. 0, 250. 0, 300. 0, 400. 0, 500. 0, 600. 0, 750. 0, 800. 0, 900. 0, 及び1000. 0 mgである。化合物は1日に1～4回の投与計画で、好ましくは1日に1回又は2回投与される。

【0035】

(8) 単位投与量

医薬組成物又は製剤は、一定の投与量を保障すべく、均一単位投与量により構成されなくてはならない。単位投与量とは、患者の治療に有効な一回の投与量を含み、薬学的に受容可能な担体と共に製剤化された一単位のことである。本発明の単位投与量を決定する場合には、製剤化される化合物（例えば、遊離脂肪酸、抗GT01ポリペプチド抗体など）の物理的、化学的特徴、期待される治療上の効果、及び該化合物に特有な製剤化における留意事項等により影響を受ける。

【0036】

6. 遺伝子治療組成物

本発明において開示される核酸分子（例えば、GT01ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挿入されたベクターなど）を患者の細胞に導入するために、*in vivo* 及び *ex vivo* という2つの主要な方法がある。*in vivo* 送達においては、治療が必要とされる患者の部位に直接注入される。*ex vivo* 処理では、治療が必要とされる患者の部位の細胞を単離し、単離された細胞に製剤化した核酸分子を導入し、導入された細胞を患者に直接又は、例えば、患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与することができる（米国特許第4, 892, 538号及び第5, 283, 187号参照）。核酸分子を生細胞に導入するために利用可能な技術は、培養細胞等に *in vitro* で導入するか、又は患者に *in vivo* で導入するかに依存して選択される。哺乳動物細胞に *in vitro* で核酸分子を導入するのに適した技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスフェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法などが挙げられる。トランスフェクションには、組換えウイルス（好ましくはレトロウイルス）粒子の細胞レセプターとの結合、次いで粒子に含まれる核酸分子の細胞への導入が含まれる。遺伝子の *ex vivo* 送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

【0037】

現在、*in vivo* 核酸移入技術で好ましいのは、ウイルス又は非ウイルスベクター（アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス(AAV)）、及びカチオン性脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである；例えば、Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996) 参照）を利用した系が含まれる。遺伝子治療で使用するために最も好ましいベクターはウイルスであり、その中でも、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス又はレトロウイルスである。レトロウイルスベクター等のウイルスベクターには、少なくとも1つの転写プロモーター／エンハンサー又は位置決定因子などが含まれる。さらに、レトロウイルスベクター等のウイルスベクターは、例えば、GT01ポリペプチドをコードする遺伝子を含んだ状態で転写される場合、該コード化遺伝子の翻訳を可能とするシスエレメント、即ち翻訳開始配列として機能する核酸配列を含む。このようなベクター構築物は、用いるウイルスに適したパッケージングシグナル、末端反復配列(LTR)又はその一部を含む。場合によっては、ベクター構築物は、ポリアデニル化並びに翻訳終結配列も含む。例えば、5' LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、DNA合成の開始点、及び3' LTR又はその一部を含む。非ウイルス性の他のベクターは、例えばカチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーを用いることもできる。

場合によっては、治療に用いる核酸を目的の細胞にターゲティングする試薬、例えば、細胞表面膜タンパク質を特異的な抗体などと共に提供するのが望ましい。現在知られてい

る遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。好適な遺伝子治療及びレトロウイルス粒子及び構造タンパク質の作成方法は、米国特許第 5, 6 8 1, 7 4 6 号を参照のこと。

【0038】

7. 医薬組成物に関するキット

医薬組成物はキット、容器、パック中に投与の説明書と共に含めることができる。本発明に係る医薬組成物がキットとして供給される場合、該医薬組成物のうち異なる構成成分が別々の容器中に包装され、使用直前に混合される。このように構成成分を別々に包装するのは、活性構成成分の機能を失うことなく、長期間の貯蔵を可能ならしめるためである。

(1) 容器

キット中に含まれる試薬は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、容器の材質によって吸着されず、変質を受けないような何れかの種類の容器中に供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、窒素ガスのような中性で不反応性ガスの下において包装されたバッファを含む。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために通常用いられる他の何れかの適切な材料などから構成される。他の適切な容器の例には、アンプルなどの類似物質から作られる簡単なボトル、及び内部がアルミニウム又は合金などのホイルで裏打ちされた包装材が含まれる。他の容器には、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジ、又はその類似物が含まれる。容器は、皮下用注射針で貫通可能なストッパーを有するボトルなどの無菌のアクセスポートを有する。

(2) 使用説明書

また、キットには使用説明書も添付される。当該医薬組成物からなるキットの使用説明は、紙又は他の材質上に印刷され、及び／又はフロッピー（登録商標）ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、オーディオテープなどの電氣的又は電磁的に読み取り可能な媒体として供給されてもよい。詳細な使用説明は、キット内に実際に添付されていてもよく、あるいは、キットの製造者又は分配者によって指定され又は電子メール等で通知されるウェブサイトに掲載されていてもよい。

【0039】

8. GT01ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを含む栄養補助組成物又は栄養補助食品

GT01ポリペプチドに対するアゴニスト又はアンタゴニストを用いて、本発明に係る新規栄養補助組成物又は栄養補助食品とする場合、通常、食品の形態は特には限定されず、通常の食品として長期間摂取することができる形状としたものが良く、例えば、錠剤、顆粒状、散剤、清涼飲料水、菓子、パン、マーガリン等を例示することができる。また、通常食品に用いられている添加物、増量剤、香料、甘味料、増粘剤等を本発明の効果が損なわれない範囲で適宜混合することができる。

【0040】

9. GT01タンパク質及びその部分ペプチドのその他の医学薬学的応用

本発明に係るGT01タンパク質およびその部分ペプチドまたはそれらの塩、ならびにそれらをコードするポリヌクレオチドは、(i) GT01タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、(ii) GT01タンパク質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、(iii) 遺伝子診断剤、(iv) GT01タンパク質に対するリガンドの定量、(v) GT01タンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物のスクリーニング、(vi) GT01タンパク質とリガンドとの結合性を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(vii) GT01タンパク質またはその部分ペプチドの定量、(viii) GT01タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体による中和、(ix) GT01タンパク質をコードする遺伝子を有する非ヒト動物の作成などに用いることができる。特に、本発明の組換え型GT01タンパク質の発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なGT01た

んばく質に対するリガンドの結合性を变化させる物質（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

【0041】

具体的には、本発明のGT01タンパク質もしくはその部分ペプチド、またはそれらの塩は、GT01タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）またはアンタゴニストをスクリーニングし、または同定するための試薬として有用である。これらの試薬は、GT01タンパク質に対するリガンドの結合性を变化させる物質のスクリーニング用キットの構成要素とすることが可能である。以上のように、本発明は、GT01タンパク質もしくはその部分ペプチド、またはそれらの塩と、試験物質との接触させることを特徴とするGT01タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）またはアンタゴニストの決定方法を提供する。試験物質としては、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清、人工的に合成した化合物等が挙げられる。

【0042】

本発明のGT01タンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する方法を実施するためには、適当なGT01タンパク質画分と、標識した試験物質が用いられる。GT01タンパク質画分としては、天然のGT01タンパク質画分、またはそれと同等の活性を有する組換え型GT01タンパク質画分等が好ましい、例えば、GT01タンパク質またはその塩に対するリガンドの決定を行うには、まずGT01タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりGT01標品を調製する。バッファーとしては、リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと受容体タンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80、デオキシコレートなどの界面活性剤や、ウシ血清アルブミンやゼラチン等のタンパク質をバッファーに加えることもできる。GT01タンパク質を含む溶液に、一定量の放射性標識した試験物質を共存させる。非特異的結合量を知るために大過剰の未尿式の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は焼く4～50℃、好ましくは約4℃～37℃で、約10分～24時間、望ましくは約30分～3時間行う。反応後、ろ過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ろ紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で計測する。全結合量から非特異的結合量を引いたカウントが0 cpmを越える試験物質を本発明のGT01タンパク質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

【0043】

以下に実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】

【0044】

GT01遺伝子のクローニング

ヒト臓器RNAパネル中の回腸total RNA、および、マウス回腸から抽出したtotal RNA 5μgから、SuperScript II（Invitrogen社）に添付の方法で、Random primer（Takara社）を用いてTotal RNA 5μgから逆転写を行い、cDNAを作成した。反応後、5'側プライマー（5'-ATGTCCCTGAATGCGCGCGGG-3'）（配列番号3）及び3'側プライマー（5'-GCCAGAAATAATCGACAAGTCA-3'）（配列番号4）を使用し、Takara EX Taq（Takara社）を用いてRT-PCRを行った。PCR反応は、cDNAの変性を95℃で2分間行った後、96℃30秒間、52℃30秒間、72℃2分間のサイクル反応を35回行い、PCR産物を増幅させた。そして、産物の伸長反応を72℃で5分間行い、4℃に冷却して反応を停止した。PCR断片をpGEM-Teasy（Promega社）ベクターにサブクローニングした後、塩基配列を決定した。ヒト、マウスのそれぞれの断片を、制限酵素で切り出し、全体を、発現ベクターpIRES（Clontech社）ベクターのプロモーター下流に載せ、全長を発現するものとした。また、PCR

する際に、ストップコドン除去したプライマーを作成し同様の手順で全長の cDNA を作成した。得られた cDNA は、pEGFP-N3 (Clontech 社) 発現ベクターと、又は当該発現ベクターの EGFP 配列部分を G16 に置換した発現ベクターへ導入することで、EGFP または G16 との融合タンパクを作成できる発現ベクターとした。

【実施例 2】

【0045】

GT01 遺伝子発現の組織分布

(1) 組織の調製

雄 C57BL/6 系マウスをエーテルで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸バッファー pH 7.4 を用いて灌流固定を行った。そして、結腸の一部を採取し、冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で内容物を除去した後、4℃で1日固定した。その後、4℃にて2日間以上20%ショ糖/0.1M リン酸バッファー pH 7.4 に置換した。置換された試料は O.C.T. Compound を用いて液体窒素で凍結させ、使用時まで -80℃で保存した。新鮮凍結試料の作成については、以下のように行った。同系統の雄マウスをエーテルで麻酔し、空腸、結腸の一部採取した後、冷 PBS で腸管内容物を洗浄した。試料は軽く水気を切り、速やかに O.C.T. Compound で包埋し、液体窒素で凍結させ、使用時まで -80℃で保存した。

【0046】

(2) RT-PCR

採取したマウス各臓器から、ISOGEN (日本ジーン) を用いて Total RNA を抽出した。得られた Total RNA 5mg から、Ready-To-Go You Prime First-Strand Beads (Amersham Bioscience 社、Sweden) を用いて RT 反応を行い cDNA を作成した。反応後、5' 側プライマー (5'-CGCACCCGCTTTCCCTTCTTCTC-3' (配列番号 3)) 及び 3' 側プライマー (5'-AGCTCTTTCCTTGATGCCCTTTGTGA-3' (配列番号 4)) を使用し、Takara EX Taq (Takara 社) を用いて RT-PCR を行った。PCR 反応は、cDNA の変性を 95℃で2分間行った後、96℃30秒間、52.3℃30秒間、72℃2分間のサイクル反応を35回行い、PCR 産物を増幅させた。そして、産物の伸長反応を72℃で5分間行い、4℃に冷却して反応を停止した。

【0047】

(3) サザンハイブリダイゼーション

RT-PCR 反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、泳動産物をニトロセルロース膜に転写させた。サザンハイブリダイゼーションのプローブを作成するため、まず pGEM-T Easy Vector (Takara 社) に組み込まれたマウスの GT01 遺伝子の配列 (配列番号 5) を制限酵素 BssHI、BglII でそれぞれ切断し、1%アガロースゲルで泳動を行った。目的のバンドを切り出した後、GENECLEAN II (Q-BIO gene 社、USA) で DNA を精製し、これをプローブ作成のための鋳型とした。マウスの GT01 遺伝子特異的 DNA プローブは、³²P 標識 dCTP (NEN 社、USA) を用い、Random Primer DNA labeling Kit Ver.2 (Takara 社) により作成した。サザンブロットを行った膜に、ハイブリダイゼーションバッファー (5xSSC、5xDenhardt's Solution、0.5% SDS) 中で ³²P 標識 DNA プローブを加え、55℃にて一晩反応させた。ハイブリダイゼーション後、55℃、10分間にて 2xSSC/0.1% SDS、続いて 0.2xSSC でプローブの洗浄を行った。これを富士イメージングプレート (富士フイルム 社) に露光し、画像解析装置 (STORM 860、Amersham Bioscience 社、Sweden) によりスキャニングを行った。

【0048】

(4) 結果

GT01 遺伝子発現の組織分布の結果は図 1 に示す。盲腸、大腸、において高頻度に発現されており、脳、肺でも比較的多くの発現がみられ、直腸、脾臓、島細胞にも発現がみられた。また、腸内分泌細胞株である STC-1 細胞においても多く発現されていること

が確認された。これに対し、心臓、肝臓、腎臓における発現は少なかった(図2)。

【実施例3】

【0049】

安定発現細胞の作製

目的の遺伝子DNAが挿入されたベクターを得るためにpEGFP-N3 (Invitrogen社)のEGFPを制限酵素KpnI、NotI (Takara社)を用いて切り出し、TaKaRa Ligation Kit ver.2 (Takara社)を用いてG16の配列を挿入した。さらにマウスGT01の配列を制限酵素、KpnI (Takara社)、TaKaRa Ligation Kit ver.2 (Takara社)を用いてG16の上流側に挿入した。

細胞へのDNA導入はエレクトロポレーション法を用いた。細胞(HEK-293、2,500,000個)を培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, GIBCO社)に懸濁し、DNA溶液(DNA量は10-15 μ g)を加えて10分間静置した後、Bio Rad Capacitance Pulse Controller Gene Pulserを用いて240V、975 μ Fの条件で導入した。

受容体DNAを導入した細胞は薬剤入り培地(G418:1.0mg/mL、ペニシリン:100unit/mL、ストレプトマイシン:100 μ g/mL、10%FCS)を用いて37℃ 5%CO₂で培養し、セクションを行った。10日後、コロニーをピックアップし、薬剤入り培地(G418 0.5mg/mL、ペニシリン:100unit/mL、ストレプトマイシン:100 μ g/mL、10%FCS)で培養した。

【実施例4】

【0050】

レセプター(GT01ポリペプチド)の細胞内移行を用いた計測

(1) アッセイ用プレートのE-C-Lコーティング

E-C-L Cell

Attachment Matrix (Upstate社)を5 μ g/mL含む無菌PBS(137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄·12H₂O、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄)をViewPlate-96 (Packard社)に各穴100 μ Lとなるように加え、37℃で1時間または4℃で一晩培養し、これを以下のアッセイに用いた。

(2) 細胞のプレートへの播種

キメラ受容体安定発現細胞(HEK細胞)をトリプシンで細胞を剥がし、10%FCS入り培地に懸濁させた。E-C-Lコーティングしたプレートに各穴の液量が100 μ Lで、かつ細胞数が 5×10^4 となるように細胞をまいて、37℃、5%CO₂条件下で一晩培養した後、培地を除き、無血清培地を各穴100 μ Lに加えた。

(3) アゴニスト(又はアンタゴニスト)のアッセイ

細胞に発現しているキメラ受容体のアゴニスト(又はアンタゴニスト)と推定される脂質を各穴1 μ Lとなるように加え、37℃、5%CO₂条件下で1時間培養した。

<細胞の固定・染色>

培養後、培地を除き、固定染色液(10 μ g/mL Hoechst No. 33342 (SIGMA社)、2%パラホルムアルデヒド(ナカライ社)を含有)を各穴100 μ L加えた後、暗所で30分静置した。

このプレートの穴を完全に覆うようにELISA TAPE (IWAKI社)を貼った。

【0051】

(4) アッセイ

解析には、Cellomics社製ArrayScan Systemを使用した。核をHoechstにより染色し、また受容体にGFPを結合させキメラ受容体とすることによって、薬物処理に伴う受容体の挙動をGFPの挙動として追跡した。細胞膜上にある局在するGタンパク質共役型受容体はリガンド刺激により、細胞質内へと内在化するものがあることが知られている。核から一定距離にあるキメラ受容体を内在化したものとして判定し、受容体の内在化が起こった細胞数の全細胞数に占める割合を各穴ごとに算出した。この算出された値をもと

に、使用した脂質がマウス G T 0 1 レセプターのアゴニスト (又はアンタゴニスト) であるかを判定した (図 3)。

【実施例 5】

【0052】

細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

(1) FLIPR による測定

細胞内カルシウム濃度の測定は次のように行った。目的の受容体を安定発現させた細胞 (H E K 細胞; 1 ウェル当たり 200,000 個) を 96 穴プレート (Collagen・Cell ware 96-well Black / Clear Plate, Becton dickinson) 上で 20 時間、37℃、5% CO_2 の条件で培養した。バッファー (H E P E S / H a n k s、pH 7.4) で希釈した FLIPR Calcium Assay Kit (Molecular Devices) を加え、1 時間、37℃、5% CO_2 で培養した。バッファー (同上) で希釈した試験薬 (各種遊離脂肪酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデカノイン酸、オクタン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸、マルガリン酸、パルミトレイン酸、エイコサトリエノイン酸、エライジン酸、ペトロセリニン酸、オレイン酸、 α リノレン酸、 γ リノレン酸、ホモ γ リノレン酸、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサトリエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、エイコサテトラエン酸、バクセン酸などを含む) を加え、FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices) を用いて 488 nm の励起光に対する 510~570 nm の蛍光強度を測定した (図 4)。図 5 に種々の遊離脂肪酸を加えた場合の H E K 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇における pEC_{50} を示す。図 5 のデータに示される脂肪酸は、ミリスチン酸 (C14:0)、ペンタデカノイン酸 (C15:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトレイン酸 (C16:1)、マルガリン酸 (C17:0)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、 α リノレン酸 (C18:3)、エイコサジエン酸 (C20:2)、エイコサトリエン酸 (C20:3)、エイコサテトラエン酸 (C20:4) である。その他、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、なども同等の pEC_{50} を示した。

【0053】

(2) CAF による測定

目的の受容体を安定発現させた細胞 (2,500,000 個) を 5 mL バッファー (135 mM NaCl , 5 mM KCl , 10 mM グルコース, 10 mM HEPES , 1.2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) で懸濁し、fura2-AM 15 μL を加えた後、37℃、40 分、浸透培養した。その後試験薬を加え、CAF-110 (Jasco) を用いて 340 nm, 380 nm の二励起光に対する 500 nm の蛍光強度比を測定した。

(2)-1. 顕微鏡下での測定

カバーガラスを底面に貼った 35 mm 培養デッシュで、細胞 (S T C-1 細胞) を培養する。C a - t y r o d e 溶液で洗浄後、2 μM fura2-AM を含む C a - t y r o d e 溶液を加え室温で 20 分間おく。C a - t y r o d e 溶液で 2 回洗浄後、1 mL の C a - t y r o d e 溶液を加え、室温で、A R G U S 200 (340/380 nm 計測) 対物レンズ 40X 15 sec 間隔で画像の取り込みを行う。取り込んだ画像のそれぞれについて ratio を計測する。10 分後 20 分後にそれぞれ、リガンドと対照となる刺激 (ボンベシン) を行う。

R N A i ベクター導入時には、同時に導入した G F P による蛍光を測定し、G F P 蛍光があり、かつ、対照での Ca^{2+} 上昇が認められる細胞についての経時的な Ca^{2+} 反応を定量し、表示した (図 6)。ここで用いた脂肪酸は、 α リノレン酸 (C18:3) である。

(2)-2. R N A i ベクターの作製と導入

Ambion 社製 p S i l e n c e r 2.1-U6 system を用いた。添付の方法に従って、目的遺伝子から選択したオリゴを合成、アニーリングした後上記のベクターにライゲーションした。得られたコンストラクトはシークエンスにて確認した。

S T C-1 細胞への遺伝子導入は Lipofectamine plus を用いて行ったのち、細胞内 Ca^{2+}

+ を顕微鏡下で測定した (図 6 下図)。結果は、GT01 に対して特異的な RNAi を行うと、 α リノレン酸の添加により観察されたカルシウム濃度上昇のピーク (図 6 上図) が消失した (図 6 下図)。従って、 α リノレン酸は GT01 を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させていることが分かった。

【実施例 6】

【0054】

GLP-1 の測定

STC-1 細胞は 24 穴プレートに 8×10^4 および 1×10^5 細胞 cm^{-2} で培養した。24-48 時間後に GLP-1 の定量を行った。細胞は、3 回ハンクス緩衝液 (HBSS) で洗浄後 0.5 mL のハンクス中、各種遊離脂肪酸 (10、30、100 μM) で 37°C 60 分間反応させた。培養上清を回収し、5 分間遠心して (約 5,000 g) 細胞片を除き、上清について、GLP-1 特異的な EIA 法のキット (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA) を用いて測定した (図 7)。ここでは、 α リノレン酸、ドコサヘキサエン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、ステアリン酸、オクタン酸、および α リノレン酸メチルエステルを用いた (図 7)。

【実施例 7】

【0055】

インサイツ (in situ) ハイブリダイゼーション

(1) cRNA プロブの作成

マウス GT01 およびマウス GLP-1 の配列から、インビトロトランスクリプション法により標識プロブの作製を行った。ジゴキシゲニンの標識には、DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Switzerland) を使用し、反応混合液 (プラスミド DNA、1x DIG RNA labeling Mix、1x Transcription buffer、1U/ml RNasin、2U/ml T7 又は SP6 RNA polymerase、RNase-free dH_2O) は全量 20 ml として行った。この反応液を 37°C で 2 時間反応させ、DNase を用いてプラスミド DNA を分解し、0.5 M EDTA 1 ml で反応を停止した。合成された cRNA プロブをエタノール沈殿し、遠心 (15000 rpm、 4°C にて 15 分間) によって得られたペレットを乾燥させた後、アルカリ加水分解液 (40 mM NaHCO_3 、60 mM Na_2CO_3 、pH 10.2) に溶解し、 60°C にて 9 分間、断片化処理を行った。処理後再びエタノール沈殿を行い、沈殿物を DEPC 水 (Milli-Q 水を 0.1% DEPC で一晩処理し、オートクレーブにて 121°C 、40 分間加熱して無毒化したもの) に溶解した。

【0056】

(2) インサイツ (in situ) ハイブリダイゼーション

マウス (C57BL/6, オス、8 週齢) 結腸を固定液 (Genostaff 社) で灌流固定したのち結腸を採取し、再度、同じ固定液による固定を行いパラフィン包埋ブロックを作製した。得られたパラフィン包埋ブロックから 4 μm の切片を作成したのち、GT01 および GLP-1 のプロブを用いてインサイツハイブリダイゼーションを行った。染色は、

Genostaff 社の方法に基づいて行った。ハイブリダイゼーション反応後、プロブの洗浄を行い、TNE (10 mM Tris-HCl pH 7.6、500 mM NaCl、1 mM EDTA) に 10 分間置換した後、20 mg/ml RNase (TNE 希釈) で過剰プロブを分解した。TNE にて 10 分洗浄した後、2x SSC、1x SSC、0.5x SSC で 20 分間の洗浄を 55°C で行った。シグナル検出のため、TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl) に 5 分間置換し、1.5% Blocking Reagent (TBS 希釈) で 37°C 1 時間、DIG 抗体のブロッキング反応を行った。TBS で 5 分間洗浄し、ヒツジ抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics, Switzerland)、1:500 (1.5% Blocking Reagent 希釈) をもちいて、室温 1 時間にて抗体反応を行った。TBST (100 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.1% Tween 20) で洗浄して抗体を除去し、NTM (100 mM Tris-HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM Mg

C1₂)に3分間置換した。そして、0.34 mg/ml NBT、0.18% BCIP (NTM希釈)にて検鏡しながら発色を行い、反応停止液(10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 8.0)にて10分処理し、発色反応を停止させた。発色後、切片はPBS中でスライドガラスにのせ、90% グリセロール(PBS希釈)で封入し、光学顕微鏡で検鏡した(図8)。観察の結果、GT01とGLP-1の発現部位がほぼ一致していることが分かった。

【実施例8】

【0057】

in vivoにおけるGT01に対するリガンドのGLP-1放出の影響

in vivoにおけるGLP-1の放出に対する、GT01のリガンド(遊離脂肪酸)の影響を検討した。

100 nmol g⁻¹量の脂肪酸(α リノレン酸、ステアリン酸、オクタン酸)を担体としてポリエチレングリコールに包含させ、24時間の断食後の8週齢のオスのC57/B6マウス(Sankyo Lab)に対し、チューブを介して胃に直接与えた。脂肪酸の投与後、2時間ジエチルエーテルで脱感覚させたのち、ヘパリナイズしたシリンジを用いて門脈より血液を採取した。血漿は、ヘパリン化された血液を、4℃、20分、1,200 x gで遠心することで調製し、GLP-1の酵素免疫アッセイ(矢内原研究所)を行った。全ての実験は施設の認可されたガイドラインに従って行った。その結果、特に、 α リノレン酸、ステアリン酸を与えた場合に、GLP-1の分泌が顕著であった(図9)。

【0058】

参考文献

- Anderson等, Science 256:808-813, 1992
Ausubel等, Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York. 1987
Beardshall等, Lancet ii 1008-1010, 1989
Brynes, A.E., Am J Clin Nutr 72:1111-1118, 2000
Chen及びOkayama, BioTechniques. 6:632-638, 1988
Cohen等, Oligodeoxynucleotides:Antisense inhibitors of gene expression. CRC Press, Boca Raton, FL. 255 pp. 1989
Drucker, Diabetes 47:159-169 1998
Drucker, Endocrinology 142:521-527, 2001
Elroy-Stein及びMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-6747, 1990
Eppstein等, Proc Natl Acad Sci USA. 82:3688-92, 1985
Fredriksson等, FEBS 554:381-388, 2003
Flint等, J Clin Invest 101:515-520 1998
Gennaro等: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2000
Guimbaud等, Pancreas 14:76-82, 1997
Goding等, Academic Press, San Diego. 492 pp. 1996
Harlow及びLane, Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp, 1988
Harlow及びLane, Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1999
Cuche, G.等, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279:G925-930, 2000
Higham等, Gut 41:24-32, 1997
Hopman等, Gastroenterology 89:1242-1247, 1985
Hwang等, Proc Natl Acad Sci USA. 77:4030-4, 1980
Isaacs等, Digestive Diseases and Sciences 32:451-480, 1987

- Jones等, Nature. 321:522-5, 1986
Kozbor等, J Immunol. 133:3001-5, 1984
Liddle, Annual Review of Physiol
59:221-242, 1997
Liddle等, Journal of Clinical Investigation 72:992-996, 1986
Lopata等, Nucleic Acids Research. 12:5707. 1984
Martin及びPapahadjopoulos, J Biol Chem. 257:286-8, 1982
Milstein等, Nature. 305:537-40, 1983
Morrison等, Genetically engineered antibody molecules and their application.
Ann NY Acad Sci. 507:187-98, 1987
Okano等, J Neurochem. 56:560-7, 1991
Presta等, Curr Opin Biotechnol. 3:394-8, 1992
Reimer R.A.等, Endocrinology 142:4522-4528, 2001
Riechmann等, Nature. 332:323-7, 1988
Rocca, A.S.等, Endocrinology 142:1148-1155, 2001
Sambrook, J. Molecular cloning: a
laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1989
Schade等, The production of avian (egg yold) antibodies: IgY. The report and
recommendations of ECVAM workshop. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA).
24:925-934, 1996
Sidhu等, J. Physiol. 528.1:165-176, 2000
Smith及びGibbs, J. Annals of the New York Academy of Science 713:236-241,
1994.
Thorens及びWaeber
Diabetes 42:1219-1225, 1993
Tonkinson等, Cancer Investigation, 14(1): 54-65, 1996
Turton等, Nature 379:69-72 1996Verhoeyen等, Science. 239:1534-6, 1988

【産業上の利用可能性】

【0059】

本発明は、糖尿病に付随した上昇した血糖値の低下およびその上昇の予防のための製剤の開発に役立つ。特に、肥満症状が著しい患者の治療に適した製剤の開発も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】 図1は、7回膜貫通型受容体の模式図を示す。

【図2】 図2は、マウスGT01遺伝子発現の組織特異性を示したものである。GAPDH（グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素）は、発現比較のコントロールとして用いた。

【図3】 図3は、GT01ポリペプチドにリガンドが結合した結果、該ポリペプチドがリガンドと共に細胞内へ移行していく様子を示す蛍光顕微鏡像を示す。

【図4】 図4は、遊離脂肪酸によって誘導された細胞内カルシウム濃度の上昇を、FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices) を用いて488nmの励起光に対する510～570nmの蛍光強度を検出することにより測定した結果を示す。

【図5】 図5は、種々の遊離脂肪酸を加えた場合のHEK細胞内Ca²⁺濃度の上昇におけるpEC₅₀を示す。

【図6】 図6は、αリノレン酸によって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇に対するヒトGT01のアンチセンスの影響を示す。

【図7】 図7は、各種脂肪酸（αリノレン酸（α-Linolenic acid）、ドコサヘキサエン酸（DHA）、パルミトレイン酸（Palmitolenic acid）、オレイン酸（Oleic acid）、ステアリン酸（Stearic acid）、オクタン酸（Octanoic acid）、αリノレン酸メ

チルエステル (α -Linolenic acid-methyl ester)) によって誘導される G L P - 1 放出量 (縦軸) を示す。脂肪酸濃度は、 $10 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ (横軸) で行った。

【図 8】図 8 は、G T 0 1 および G L P - 1 に関する、マウス結腸におけるインサイツハイブリダイゼーションの結果を示す。

【図 9】マウスに各種脂肪酸 (α リノレン酸 (α -Linolenic acid)、ステアリン酸 (Stearic acid)、オクタン酸 (Octanoic acid)) を与えたことによる、マウス血中の G L P - 1 濃度の変動を示す。ネガティブコントロールとして、脂肪酸および担体を与えなかった場合 (Control)、担体 (Vehicle) のみを与えた場合について測定した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmadesign, Inc.
Tsujimoto, Gozo
Hirasawa, Akira

<120> OrphanGPCR and its ligand

<130> PDP-0044

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Pro Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
85 90 95

Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Glu Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
130 135 140

Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Thr Ser Glu His Leu Leu Asp Ala
225 230 235 240

Arg Ala Val Val Thr His Ser Glu Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
245 250 255

Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
260 265 270

Gln Gln Asp Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
275 280 285

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
290 295 300

Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
305 310 315 320

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
 325 330 335

Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
 340 345 350

Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
 355 360 365

Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
 370 375

<210> 2
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Ser Pro Glu Cys Ala Gln Thr Thr Gly Pro Gly Pro Ser His Thr
 1 5 10 15

Leu Asp Gln Val Asn Arg Thr His Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
 20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ser Val Val Glu Thr Thr Val Leu Gly
 35 40 45

Leu Ile Phe Val Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
 50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Ser Leu Val Leu Asn
 65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Thr Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
 85 90 95

Val Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Val Cys His

100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Met Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Glu Arg Met Val Cys Ile Val Arg Leu Arg
130 135 140

Arg Gly Leu Ser Gly Pro Gly Arg Arg Thr Gln Ala Ala Leu Leu Ala
145 150 155 160

Phe Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Leu Ala Ala Leu Pro Leu Cys Ile Leu
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Gly Asp Gln Glu Ile Pro
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Asp Trp Pro Asn Arg Ile Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Phe Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
225 230 235 240

Leu Thr Leu Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
245 250 255

Gln Gln Asp Tyr Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
260 265 270

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
275 280 285

Ile Gln Asn Phe Arg Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
290 295 300

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
305 310 315 320

Tyr Asn Met Ser Leu Phe Arg Asn Glu Trp Arg Lys Ile Phe Cys Cys
325 330 335

Phe Phe Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Phe Thr Asp Thr Ser Val Arg
340 345 350

Arg Asn Asp Leu Ser Val Ile Ser Ser
355 360

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3
atgtcccctg aatgcgcgcg gg 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4
gccagaaata atcgacaagt ca 22

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

cgcacccgct ttcccttctt ctc

23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

agctctttcc ttgatgcctt tgtga

25

<210> 7

<211> 1389

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

cagatgagcg ctctctcaga cagcggcggg cggccgggcg cccggcatgt cccctgagtg 60

tgcacagacg acgggccctg gcccctcgca caccctggac caagtcaatc gcacccactt 120

ccctttcttc tcggatgtca agggcgacca ccggttggtg ttgagcgtcg tggagaccac 180

cgttctgggg ctcatctttg tcgtctcact gctgggcaac gtgtgtgctc tagtgctggt 240

ggcgcgccgt cggcgccgtg gggcgacagc cagcctgggtg ctcaacctct tctgcgcgga 300

tttgctcttc accagcgcca tcctctagt gctcgtcgtg cgctggactg aggcctggct 360

gttggggccc gtcgtctgcc acctgctctt ctacgtgatg acaatgagcg gcagcgtcac 420

gatcctcaca ctggccgcgg tcagcctgga gcgcatgggtg tgcacgtgc gcctccggcg 480

cggcttgagc ggcccggggc ggcggactca ggcggcactg ctggctttca tatggggtta 540

ctcggcgctc gccgcgctgc ccctctgcat cttgttccgc gtgggtcccgc agcgccttcc 600

cggcggggac caggaaattc cgatttgcac attggattgg cccaaccgca taggagaaat 660

ctcatgggat gtgttttttg tgactttgaa cttcctgggtg ccgggactgg tcatttgtgat 720

cagttactcc aaaattttac agatcacgaa agcatcgcgg aagaggctta cgctgagctt 780

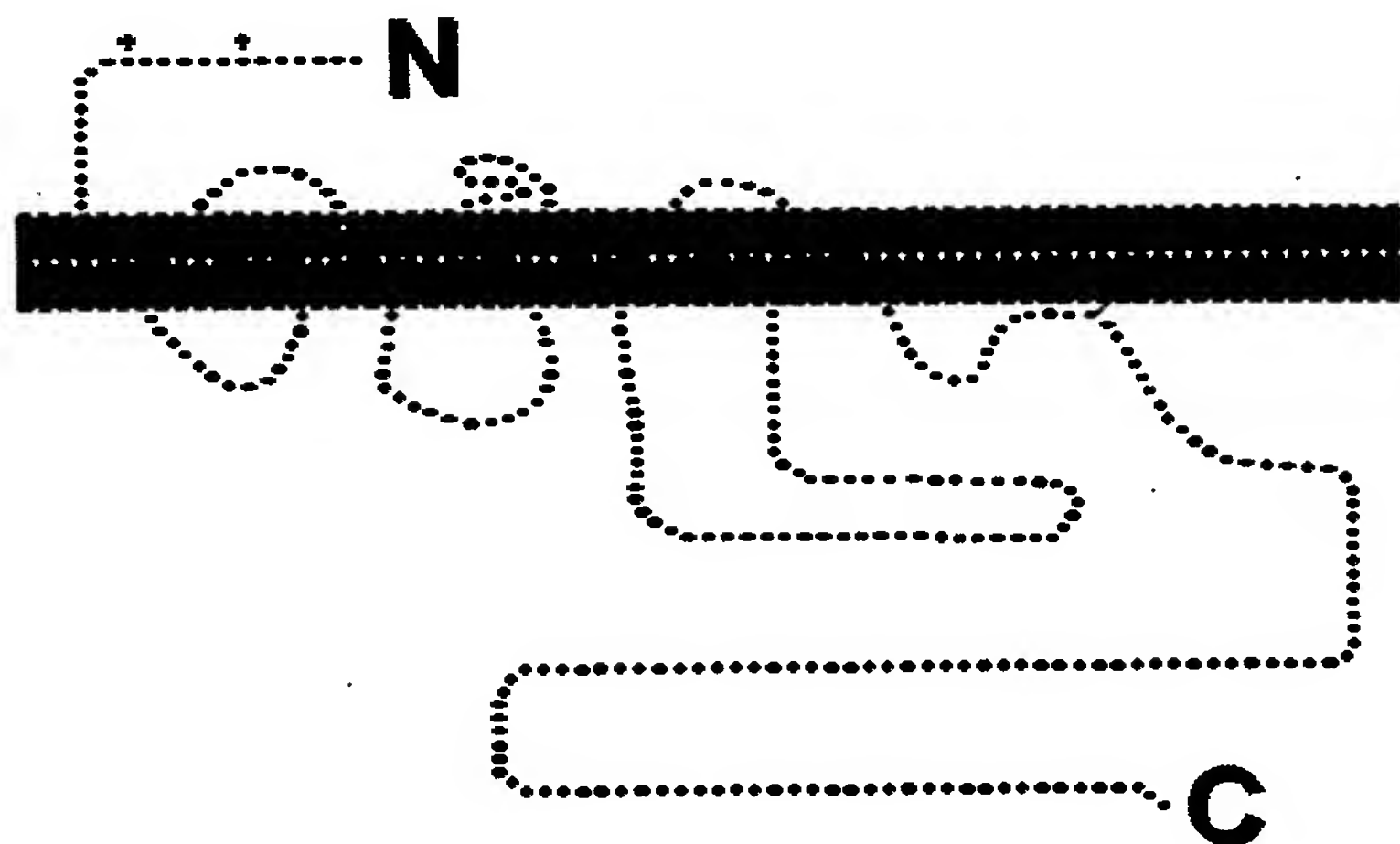
ggcatactct gagagccacc agatccgagt gtcccaacaa gactaccgac tcttccgcac 840

gctcttcctg ctcatggttt ctttcttcat catgtggagt cccatcatca tcaccatcct 900

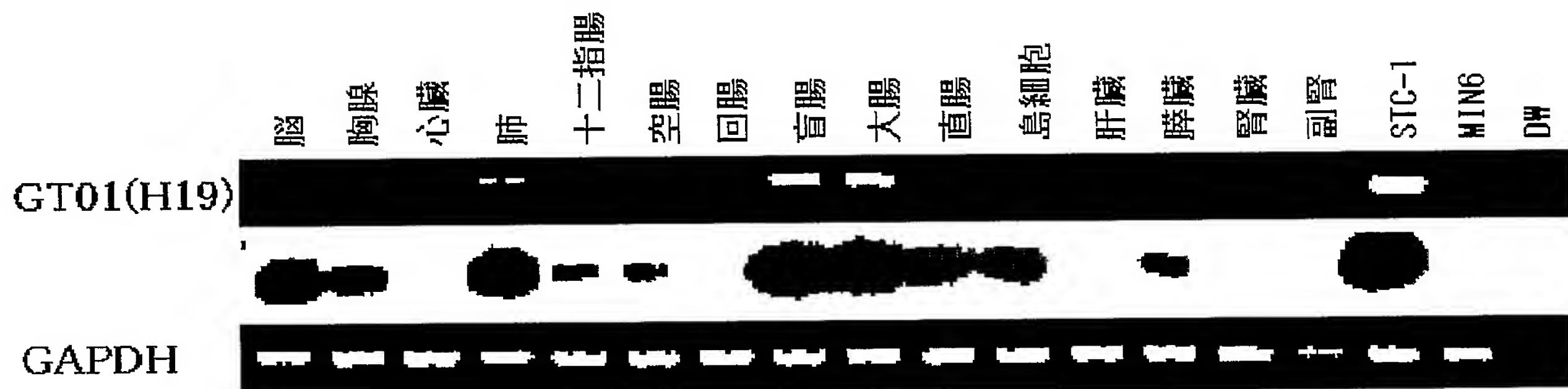
cctcatcttg atccaaaact tccggcagga cctgggtcatc tggccatccc ttttcttctg 960
ggtggtggcc ttcacgtttg ccaactctgc cctaaacccc atactgtaca acatgtcgct 1020
gttcaggaac gaatggagga agattttttg ctgcttcttt tttccagaga agggagccat 1080
ttttacagat acgtctgtca ggcgaaatga cttgtctgtt atttccagct aactagcctc 1140
tggtgccagg tgaaccacgg tgtgcatgta aaggagagta acttcaagga aagcccacca 1200
gtgcgccctg ctttaaaaat acccgacttc caacagcagg catctacgga gccagcaaat 1260
taaggaatga tcgctcagta taaaaatatt tttccttaaa agaactttct atgggttcct 1320
tttgtgaact ttttttagtg tgtttgtaat atgatctagt taataaatTT ttatttataa 1380
ctgttccta 1389

【書類名】 図面

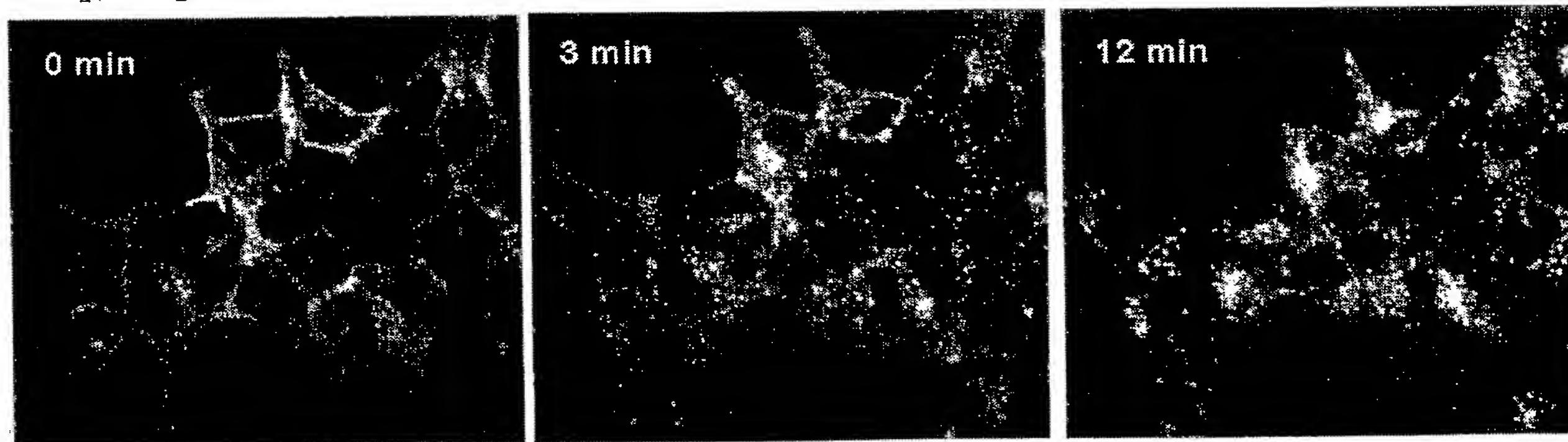
【図 1】



【図 2】

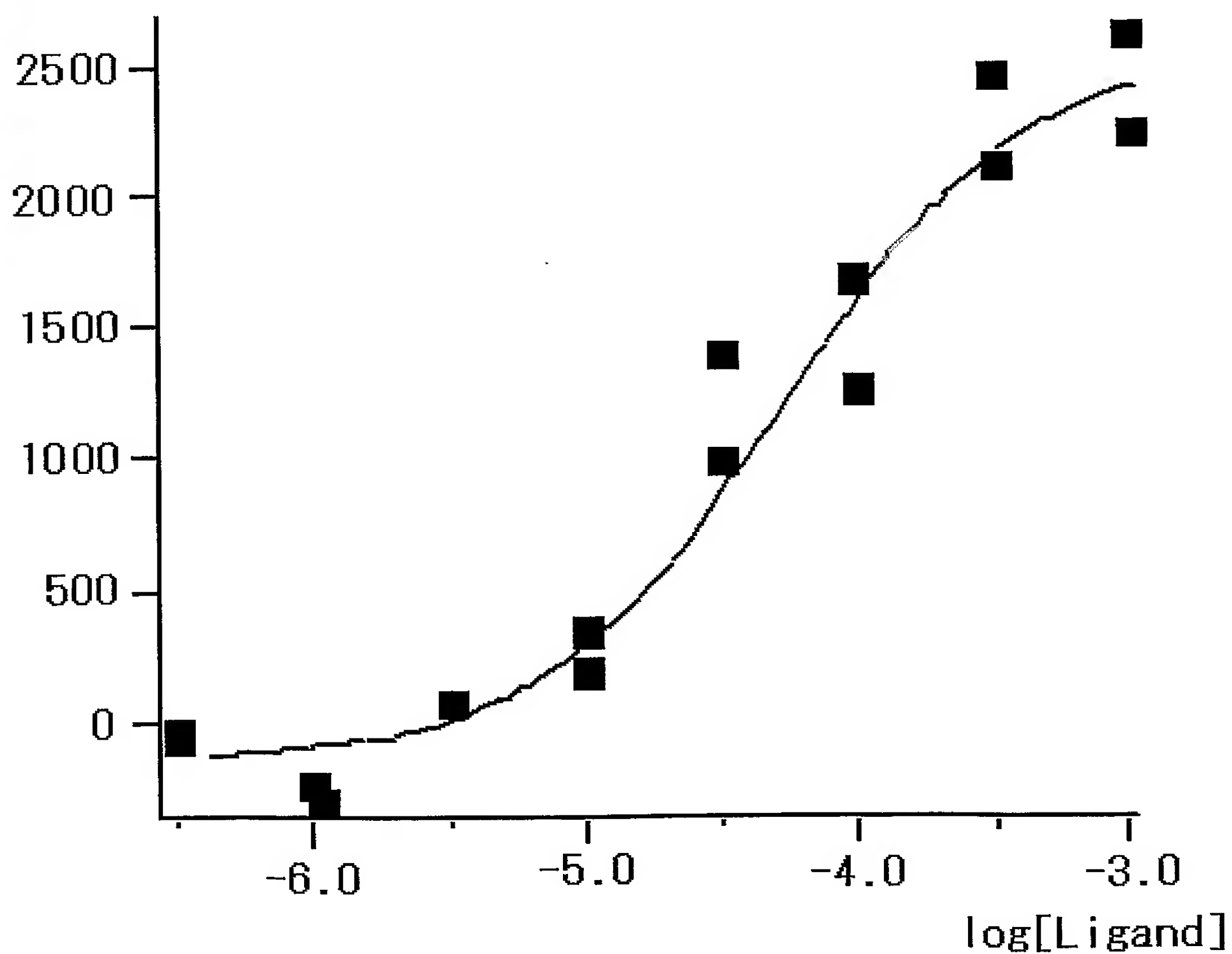
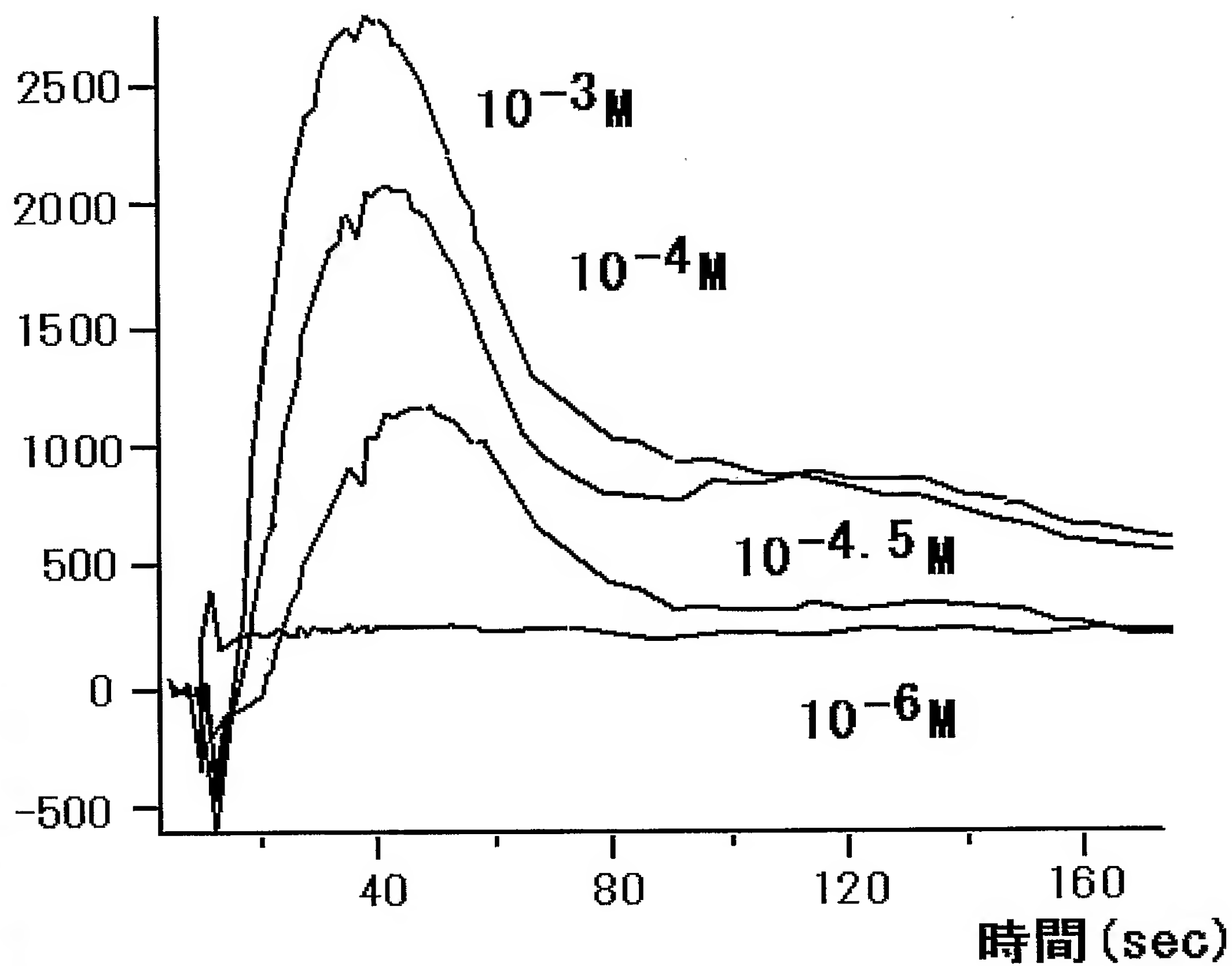


【図 3】



【図 4】

蛍光量の変化

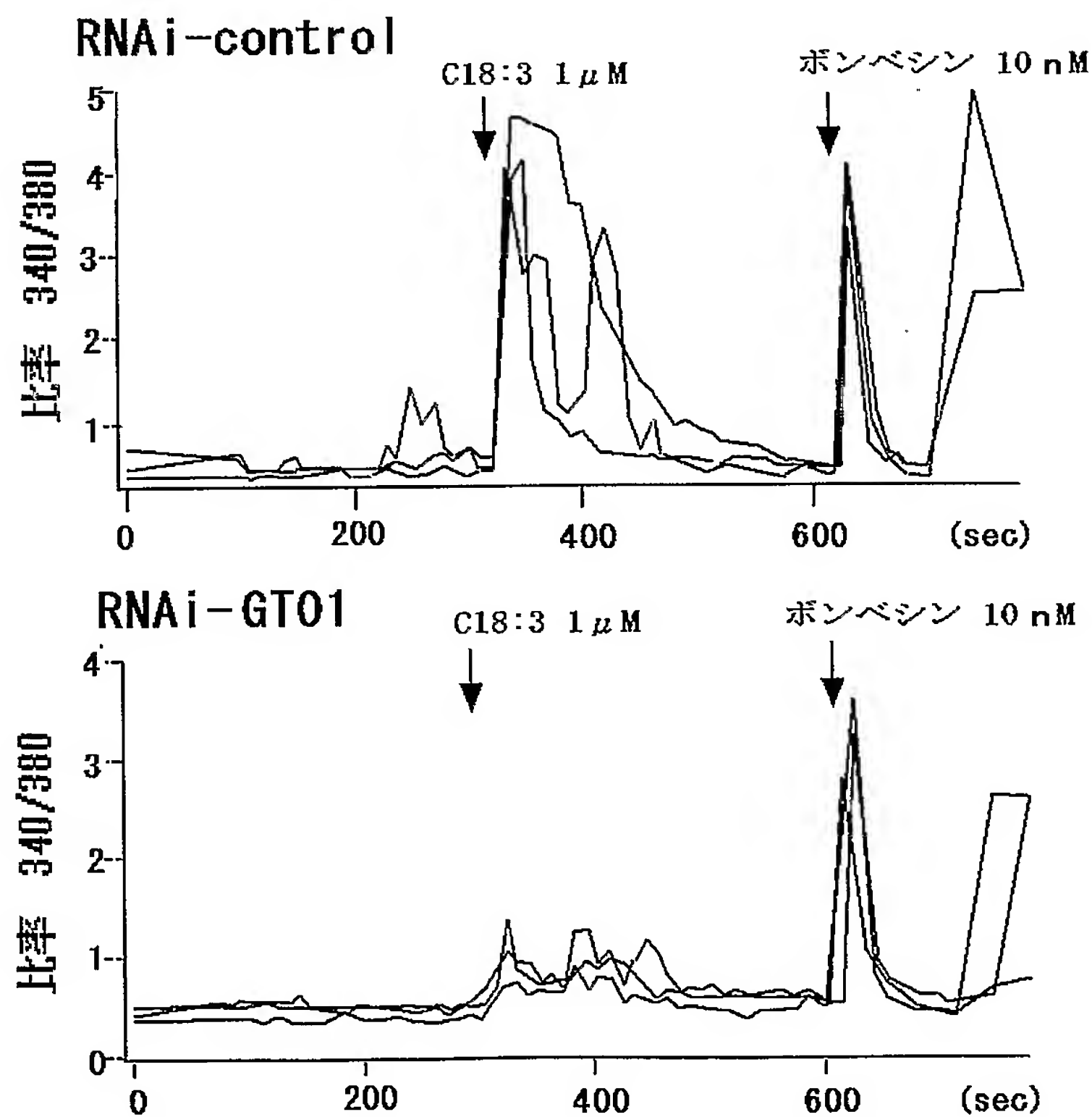


【図 5】

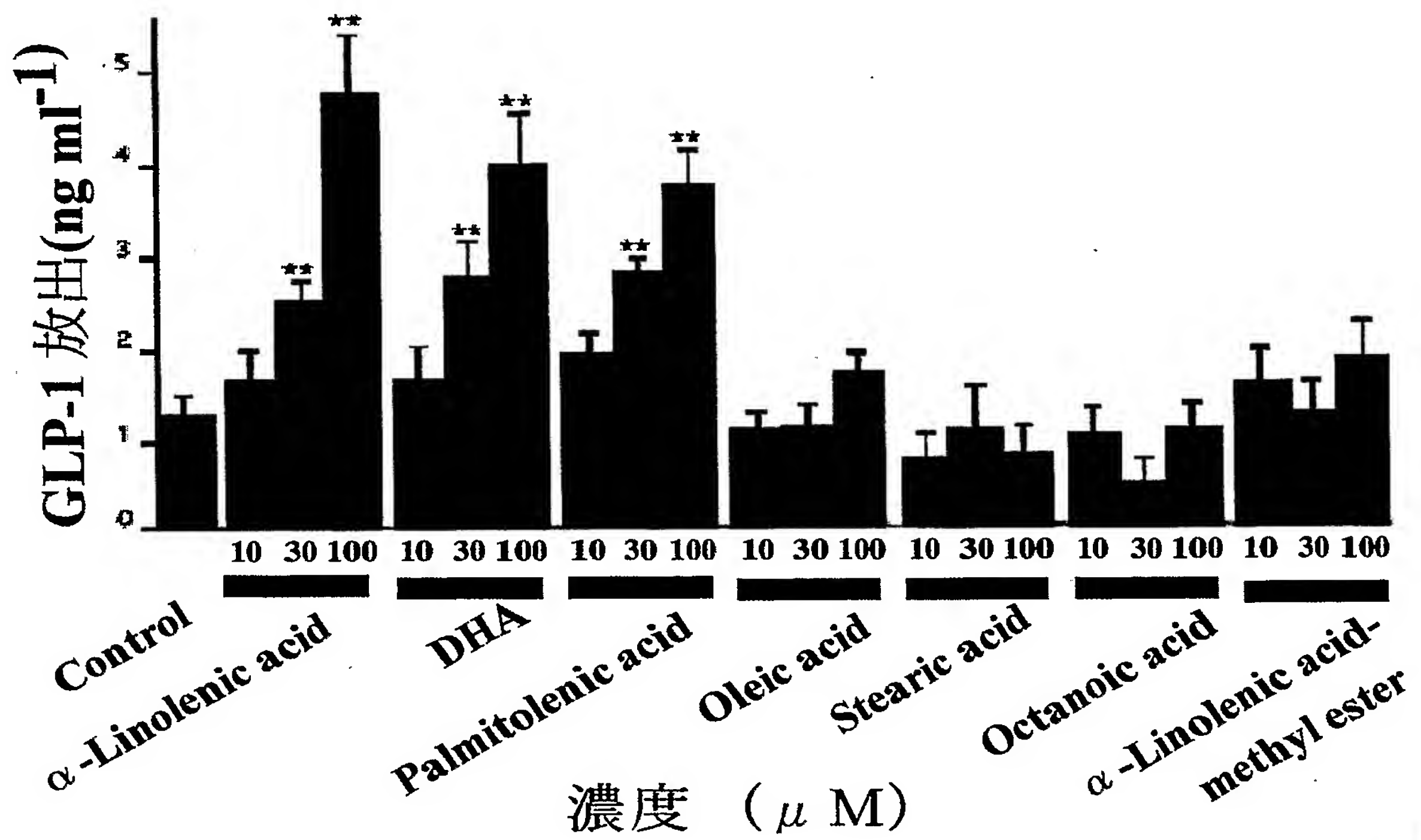
H19(GT01)-G16 キメラを発現するHEK細胞中
での $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を誘起する遊離脂肪酸の能力
(pEC₅₀)

不飽和 炭素数 \ 結合数	0	1	2	3	4
C8	—				
C9	—				
C10	—				
C11	—				
C12	—				
C14	4.4				
C15	4.3				
C16	4.2	5.1			
C17	4.4				
C18	4	4.5		6.3	
C20	—		4.6	4.8	5.5
C22	—				
C23	—				

【図 6】

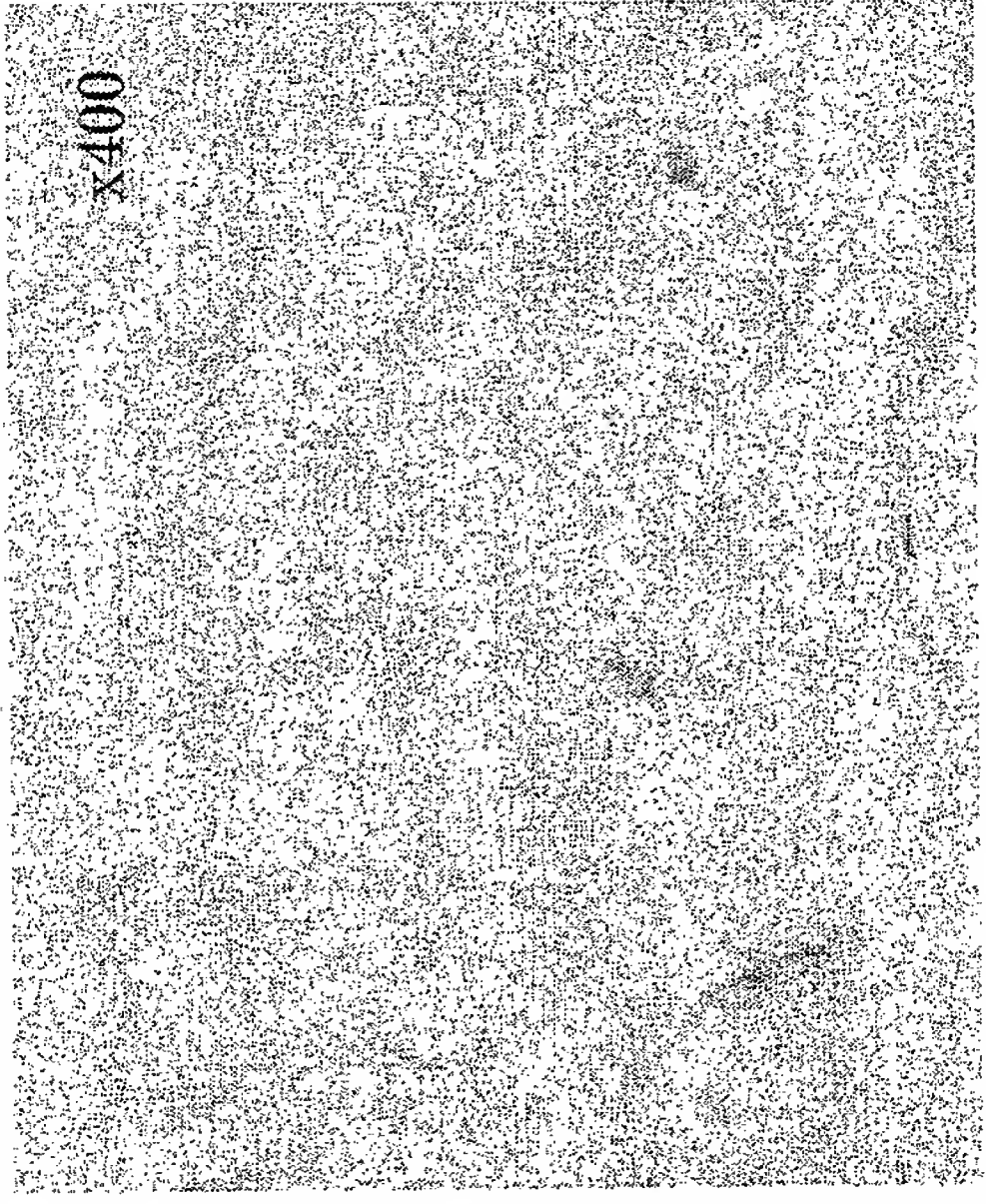
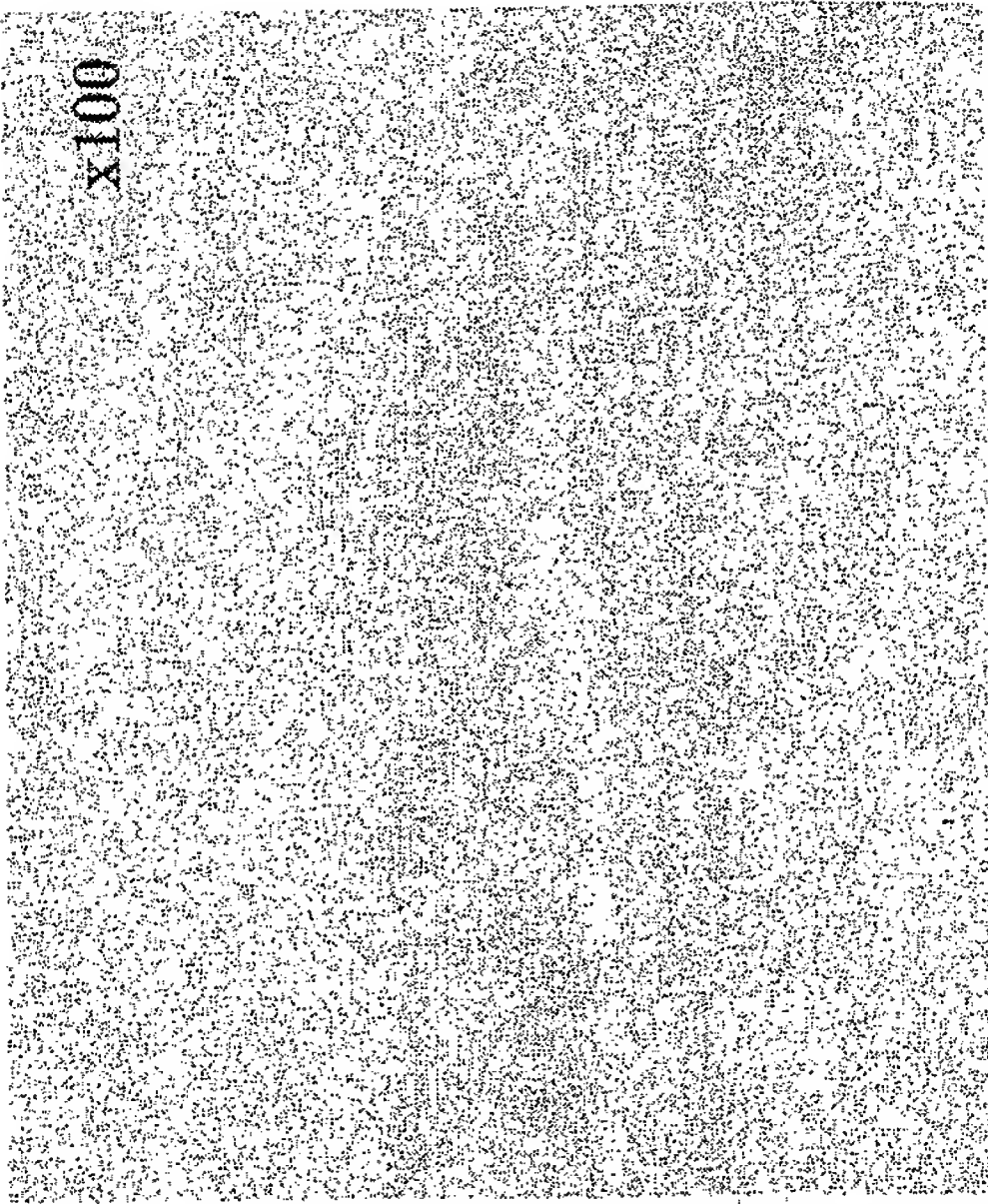


【図 7】

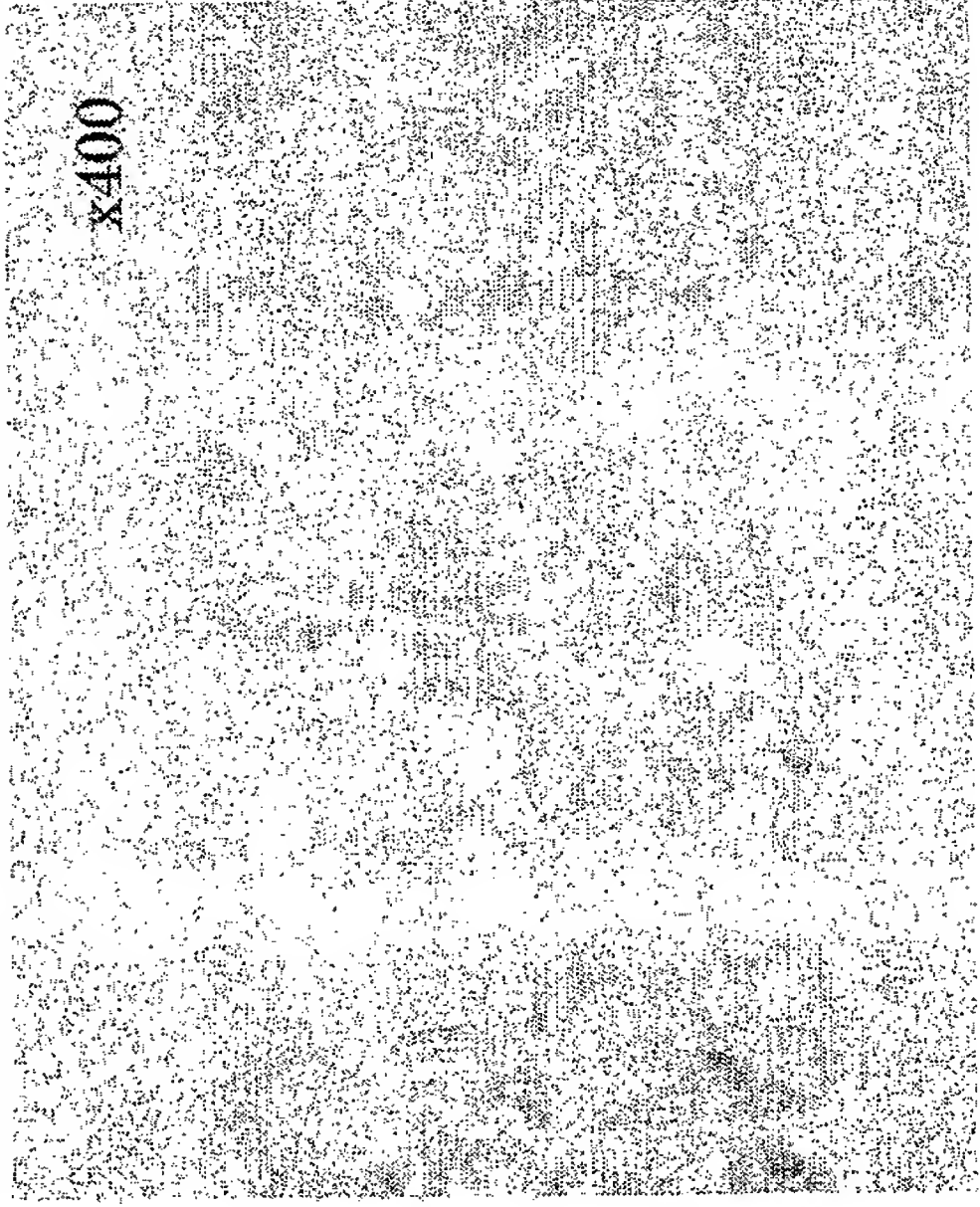
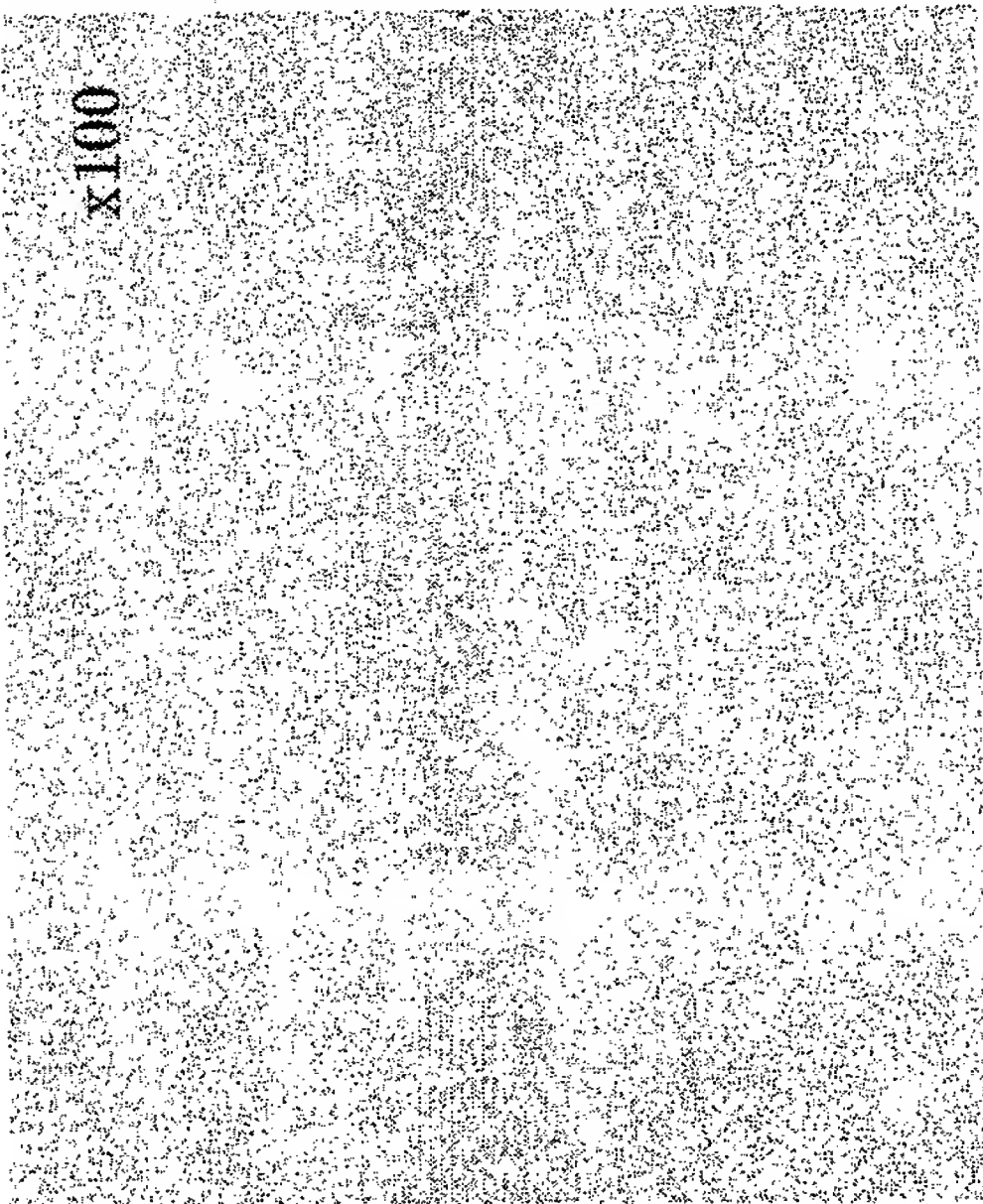


【図 8】

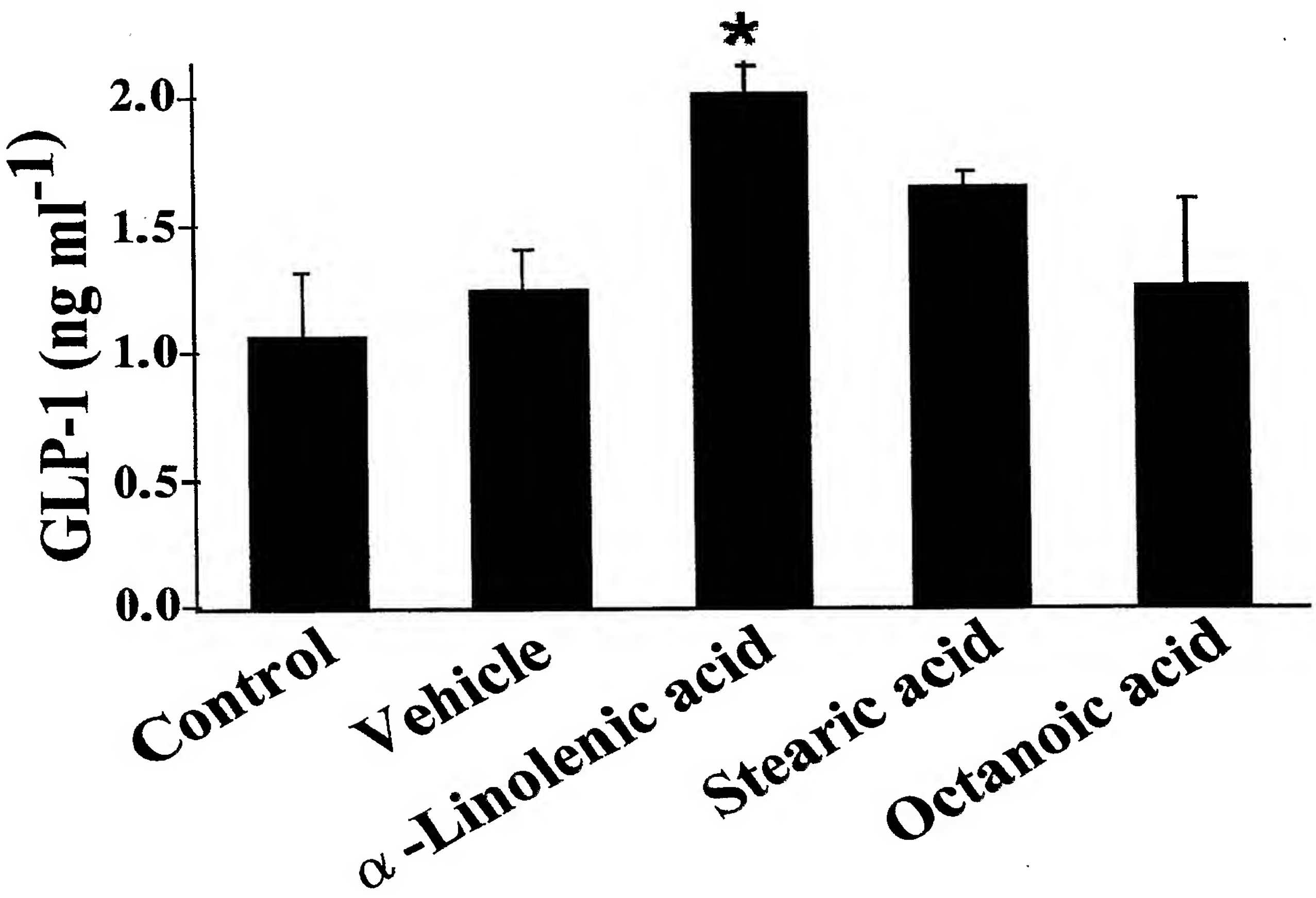
GLP-1
(IHC)



GT01
(ISH)



【図 9】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 糖尿病に付随する上昇した血糖値の低下および血糖値上昇の予防のために供される医薬組成物及びそのキットの提供を目的とする。

【解決手段】 本発明は、糖尿病に付随する高血糖症の治療に供される、G T 0 1 ポリペプチドのリガンド（アゴニスト又はアンタゴニスト）、特に、G T 0 1 ポリペプチド特異的リガンドである遊離脂肪酸、及びG T 0 1 遺伝子、G T 0 1 ポリペプチドを含む医薬組成物及びそのキットの提供、ならびにG T 0 1 ポリペプチドに対する特異的リガンド、およびG T 0 1 ポリペプチドと特異的リガンドとの結合に影響を与えるスクリーニング方法を提供する。

【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 6 4 5 2
受付番号	5 0 4 0 0 3 3 3 4 2 5
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 5 月 2 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成16年 3月 1日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	500386563
【住所又は居所】	東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八 丁堀ビル 5 階
【氏名又は名称】	株式会社ファルマデザイン
【特許出願人】	
【識別番号】	504080593
【住所又は居所】	東京都世田谷区中町 1 - 2 1 - 4
【氏名又は名称】	平澤 明
【特許出願人】	
【識別番号】	504080607
【住所又は居所】	東京都世田谷区中町 1 - 1 4 - 1 8
【氏名又は名称】	辻本 豪三

特願 2 0 0 4 - 0 5 6 4 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 0 3 8 6 5 6 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 4 月 2 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区八丁堀 2 丁目 1 9 番 8 号 長谷工八丁堀ビル 5 階

氏 名

株式会社ファルマデザイン

特願 2 0 0 4 - 0 5 6 4 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 0 8 0 5 9 3]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 3 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区中町 1 - 2 1 - 4

氏 名

平澤 明

特願 2 0 0 4 - 0 5 6 4 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 4 0 8 0 6 0 7]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 3 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区中町 1 - 1 4 - 1 8

氏 名

辻本 豪三